

Die Rolle des EGF- Rezeptors bei der mitogenen  
Signaltransduktion des  $\beta_2$ - adrenergen Rezeptors

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
**doctor rerum naturalium**

vorgelegt dem Rat der Biologisch- Pharmazeutischen Fakultät der  
Friedrich- Schiller- Universität Jena

von Dipl.- Biochem. Sebastian Drube  
geboren am 29.08.1974 in Weimar

Gutachter:

1. Prof. Dr. Claus Liebmann
2. Prof. Dr. Reinhardt Wetzker
3. Prof. Dr. Bernd Nürnberg

Tag der Prüfung: 29.11.2005

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.12.2005

**Für meine Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	
1.1. Rezeptortyrosinkinasen	1
1.1.1. Liganden- induzierte Dimerisierung von Rezeptortyrosinkinasen	2
1.1.2. Regulation der Tyrosinkinaseaktivität von Rezeptortyrosinkinasen	2
1.2. Der EGFR	2
1.2.1. Aufbau des EGFR	3
1.2.2. EGF- induzierte Dimerisierung	3
1.2.3. Die Kinasedomäne des EGFR und deren Regulation	5
1.2.4. Die Autophosphorylierungsstellen des EGFR	6
1.2.5. Signalweiterleitung des aktivierten EGFR	7
1.3. c- Src als typischer Vertreter der Src- Kinasefamilie	8
1.3.1. Wechselwirkungen zwischen c- Src und dem EGFR	10
1.4. G- Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)	10
1.4.1. Die mitogene Signaltransduktion verschiedener G- Proteine	11
1.4.2. G <sub>s</sub> - Proteine	12
1.4.3. cAMP- vermittelte Inhibition der MAP- Kinase (MAPK)	12
1.4.4. cAMP- vermittelte Aktivierung der MAPK	13
1.4.5. Der $\beta_2$ - adrenerge Rezeptor	13
1.4.6. EGFR- Transaktivierung	15
<b>2. Zielstellung</b>	18
<b>3. Material und Methoden</b>	19
3.1. Methoden	24
3.1.1. Zellkultur	24
3.1.2. Transfektion mit DEAE- Dextran	24

3.1.3.	Transfektion mit Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)	24
3.1.4.	Immunopräzipitation	24
3.1.5.	MAPK- Assay	25
3.1.6.	SDS- PAGE	25
3.1.7.	Westernblot (Semi-Dry-Technik)	25
3.1.8.	Immunologischer Nachweis der Proteine	26
3.1.9.	Inositolphosphatbestimmung	26
3.1.10	PKC- Translokation	27
3.1.11.	Statistik	27

## **4. Ergebnisse**

4.1.	Die Transaktivierung des EGFR	28
4.1.1.	Die MMP- unabhängige Transaktivierung des EGFR durch Isoprenalin	28
4.1.2.	c- Src vermittelt die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung des EGFR und die Aktivierung von ERK1/2	29
4.1.3.	LPA induziert über die Aktivierung von MMPs eine Vielzahl von Signalwegen downstream des EGFR	33
4.1.4.	HB- EGF- vermittelte Aktivierung der PLCγ1 und von ERK1/2	35
4.1.5.	Übersicht der Isoprenalin-, LPA-, EGF- und HB- EGF- induzierten Signalwege	36
4.2.	Der Einfluss des Aktivierungszustandes des EGFR auf mitogene Signalwege des β <sub>2</sub> - AR	38
4.2.1	Der konzentrations- und zeitabhängige Verlauf der EGF- induzierten Aktivierung der PLCγ1	38
4.2.2.	Die Überexpression des EGFR führt zu einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1	40
4.2.3.	Die Kostimulation bewirkt in COS- 7- Zellen eine Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1	41
4.2.4.	Durch Überexpression des EGFR wird eine Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 bewirkt	42
4.2.5.	Durch die Präaktivierung des EGFR kann eine Isoprenalin- induzierte Inositolphosphatfreisetzung bewirkt werden	44

4.2.6.	Die Abhängigkeit der Isoprenalin- induzierten Tyrosin- phosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 von der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR	45
4.2.7.	Die Abhängigkeit der Isoprenalin- induzierten Tyrosin- phosphorylierung der PLC $\gamma$ von c- Src	48
4.2.8.	Die Abhängigkeit der Isoprenalin- induzierten Tyrosin- phosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 von EGFR- Y845	50
4.2.9.	Die Abhängigkeit der Isoprenalin- induzierten Tyrosin- phosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 vom Dimerisierungszustand des EGFR	52
4.3.	Durch die Kostimulation wird eine partiell Ras- unabhängige Aktivierung von ERK1/2 induziert	56
4.4.	c- Src und Fyn als spezifische Vermittler GPCR-, nicht jedoch EGFR- induzierter mitogener Signalwege in COS- 7- Zellen	60
4.4.1.	Widersprüchliche Ergebnisse bei der Verwendung von PP2 und dnSrc- Mutanten bei EGF- induzierten Signalwegen in COS- 7- Zellen	60
4.5.	Die c-Src- abhängige Phosphorylierung von EGFR-Y845 ist vom Expressionslevel von c- Src und des EGFR abhängig	66
4.5.1.	Auswirkungen der Überexpression des EGFR und von c-Src auf die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845	71
4.5.2.	Die EGF- vermittelte Phosphorylierung von EGFR- Y845 in anderen Zelllinien	72
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
5.1.	Vergleich der Isoprenalin- und LPA- induzierte Transaktivierung des EGFR	75
5.2.	Die Simulation der Ligand- vermittelten Transaktivierung durch Erhöhung der Basalaktivität des EGFR	78
5.3.	Src- Kinasen als spezifische Vermittler GPCR- induzierter mitogener Signalwege	85
5.4.	c- Src- abhängige und c- Src- unabhängige Phosphorylierung von EGFR- Y845	90

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
<b>7.</b>	<b>Referenzen</b>	<b>95</b>

## **Anhang**

Abkürzungsverzeichnis

Danksagung

Selbständigkeitserklärung

## 1. Einleitung

In lebenden Zellen findet ein Netzwerk biochemischer Prozesse statt, die einer ständigen Kontrolle und Regulation bedürfen. Dabei werden Biosynthese, Abbau und energetische Verwertung von Metaboliten und Makromolekülen an den aktuellen Bedarf, die Umweltbedingungen und den Entwicklungsstand der Zelle angepasst. Um intrazelluläre Prozesse aufeinander abstimmen zu können, müssen Zellen daher ständig in der Lage sein, mit ihrer Umgebung zu kommunizieren. Die Veränderungen in der Umgebung werden durch Zelloberflächenrezeptoren registriert und über intrazelluläre Signalketten verarbeitet. Dadurch kommt es zum Ein- bzw. Abschalten bestimmter Stoffwechselprozesse und/oder bestimmter Gene. Als Folge können so Differenzierungs-, Zellteilungs- oder apoptotische Prozesse ausgelöst werden.

Die Signalübermittlung kann von verschiedenen Rezeptorklassen vermittelt werden. Dazu zählen zum Beispiel Rezeptortyrosinkinasen, wie der Epidermale Wachstumsfaktor- Rezeptor (EGFR), der Plättchen- Wachstumsfaktor- Rezeptor (PDGFR) und Fibroblasten- Wachstumsfaktor- Rezeptor (FGFR); G- Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), wie die  $\alpha$ - und die  $\beta$ - adrenergen Rezeptoren; Liganden- und Potential- gesteuerte Ionenkanäle und Steroidrezeptoren. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung bestimmter mitogener Signalwege, die von GPCRs und Rezeptortyrosinkinasen vermittelt werden können. Im Folgenden soll daher auf die Klassen der Rezeptortyrosinkinasen und der GPCRs näher eingegangen werden.

### 1.1. Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen sind an einer Vielzahl biologischer Prozesse und deren Steuerung beteiligt. Durch diese zentrale Rolle ist eine genaue Regulation der Expression und der Funktion dieser Signalproteine von großer Bedeutung. Gerät diese Regulation außer Kontrolle, kann dies negative Auswirkungen auf die Zelle und den Organismus haben (wie z.B. die Entstehung von Tumoren).

Rezeptortyrosinkinasen befinden sich in der Zellmembran und bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer transmembranalen Domäne und einer intrazellulären, cytoplasmatischen Domäne mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität. Dieser Aufbau macht es möglich, dass ein Signal in Form eines Liganden von der extrazellulären Domäne registriert wird und anschließend in den intrazellulären Raum weitergeleitet werden kann. Dort wird das Signal durch die Kinasedomäne in chemische Phosphorylierungsreaktionen umgewandelt, was zur Aktivierung bestimmter Signalproteine führt. Dadurch werden Signalkaskaden eingeschaltet, die zur Vervielfältigung und somit zur Verstärkung des extrazellulären Signals führen.



### 1.1.1. Ligand- induzierte Dimerisierung von Rezeptortyrosinkinasen

Die Ligand- induzierte Dimerisierung von Wachstumsfaktor- Rezeptoren ist in der Natur ein weit verbreitetes Phänomen, das die Aktivität dieser Rezeptoren und deren Signalwege reguliert. Zwei Rezeptormonomere werden dabei in räumliche Nähe zueinander gebracht. Dadurch wird die Tyrosinkinaseaktivität der Rezeptoren aktiviert und die Autophosphorylierung des Rezeptordimers eingeleitet. Dabei wird die Dimerisierung der Rezeptormonomere sehr unterschiedlich induziert. Dies hängt unter anderem von der Struktur der Liganden selbst ab. Liganden, die wie FGF einen monovalenten Aufbau aufweisen, vermitteln die Dimerisierung über die Ausbildung eines 2:2- Liganden- Rezeptor- Komplexes ("Rezeptor- vermittelte Dimerisierung"). Im Unterschied dazu induzieren bivalente Liganden, wie die Cytokine, GH und EPO oder der Wachstumsfaktor PDGF, die Dimerisierung über die Wechselwirkung mit zwei Rezeptormonomeren unter Ausbildung eines 1:2- Liganden- Rezeptor- Komplexes ("Liganden- vermittelte Dimerisierung") (de Vos et al. 1992; Kossiakoff und de Vos, 1998; Jiang und Hunter, 1999).

### 1.1.2. Regulation der Tyrosinkinaseaktivität von Rezeptortyrosinkinasen

Die Tyrosinkinase- Domänen der meisten RTKs sind vor der Dimerisierung katalytisch inaktiv. Die Regulation der Kinaseaktivität wird hauptsächlich durch hoch- konservierte Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife vermittelt (z.B.: Y1163 des Insulinrezeptors). Die Aktivierungsschleife befindet sich vor der Ligandenbindung im katalytischen Zentrum der Rezeptormonomere und verhindert so die Substratbindung. Ebenso stabilisiert die Aktivierungsschleife im aktiven Zentrum die katalytischen Seitenketten in einer nicht funktionellen und inaktiven Konformation (Huse and Kuriyan, 2002). Durch die Ligandenbindung kommt es zu massiven Konformationsänderungen im gesamten Rezeptor, die zur Autophosphorylierung der hoch- konservierten Tyrosinreste auf der Aktivierungsschleife führen. Daraufhin entfernt sich die Aktivierungsschleife aus dem aktiven Zentrum und macht es für Substratproteine zugänglich. So wird die maximale Tyrosinkinaseaktivität der Rezeptoren erreicht und die Transautophosphorylierung des gebildeten Rezeptordimers eingeleitet. Obwohl der Aufbau der Tyrosinkinasedomäne bei den meisten Rezeptortyrosinkinasen hoch- konserviert ist, erfolgt die Regulation der Aktivität der Kinasedomäne des EGFR durch andere Mechanismen (siehe Kapitel 1.2.2. und 1.2.3.).

## **1.2. Der EGFR**

Ein wichtiger Vertreter der Rezeptortyrosinkinasen ist der EGFR (ErbB1), der zur Familie der ErbB- Rezeptoren zählt. Zu ihr gehören weiterhin die Rezeptortyrosinkinasen Erb2, Erb3 und Erb4. Diese Rezeptoren weisen alle einen vergleichbaren Aufbau auf. Da einer der Schwerpunkte dieser Arbeit auf der ErbB1- vermittelten Signaltransduktion liegt, wird auf die genaue Beschreibung des Aufbaus und der Funktion von Erb2, Erb3 und Erb4 verzichtet.

### 1.2.1. Aufbau des EGFR

Wie alle Rezeptortyrosinkinasen besteht auch der EGFR aus einer extrazellulären, einer transmembranalen und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne ist in vier Subdomänen unterteilt, die als L1, CR1, L2 und CR2 bezeichnet werden (Ward et al., 1995). L1 und L2 dienen als Ligandenbindungsdomänen, die cysteinreichen Subdomänen CR1 und CR2 hingegen als Regulatoren der Rezeptordimerisierung. Besonders wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass die für die Dimerisierung essentielle Dimerisierungsschleife ein Bestandteil der CR1- Domäne ist.

Die transmembranale Domäne besteht aus einer ca. 23 AS langen  $\alpha$ - Helix, die für die Stabilisierung der entstandenen Rezeptordimere und die Signalweiterleitung sorgt (Sternberg et al., 1989; Worthylake, 1997; Schaefer et al., 1999; Qian et al., 1999; Paniel et al., 2002; Mendrola et al., 2002). Die Tyrosinkinase ist aus der ATP- und Substratbindungsstelle, sowie der Aktivierungsschleife aufgebaut. Die Aufgabe der Tyrosinkinase besteht hauptsächlich darin, durch Tyrosinphosphorylierungen von Signalproteinen die Weiterleitung des extrazellulären Signals in den intrazellulären Raum zu gewährleisten.

### 1.2.2. EGF- induzierte Dimerisierung

Die Dimerisierung und Aktivierung der Mitglieder der ErbB- Rezeptorfamilie können durch eine Reihe von EGFR- Liganden induziert werden. Zu diesen Liganden zählen EGF, TGF $\alpha$ , Amphiregulin, Neuregulin, Heregulin, Betacellulin, Epiregulin und EGF- ähnliche Wachstumsfaktoren, wie HB- EGF. Diese Liganden weisen für die verschiedenen EGFR- Subtypen unterschiedliche Präferenzen auf. So binden EGF, TGF $\alpha$  und Amphiregulin nur an den EGFR (ErbB1), während Neuregulin und Heregulin an ErbB3 und ErbB4 binden. Betacellulin, Epiregulin und EGF- ähnliche Wachstumsfaktoren (HB- EGF) sind ausschließlich Liganden von ErbB4 und ErbB1. Für ErbB2 konnte allerdings noch kein physiologischer Ligand identifiziert werden.

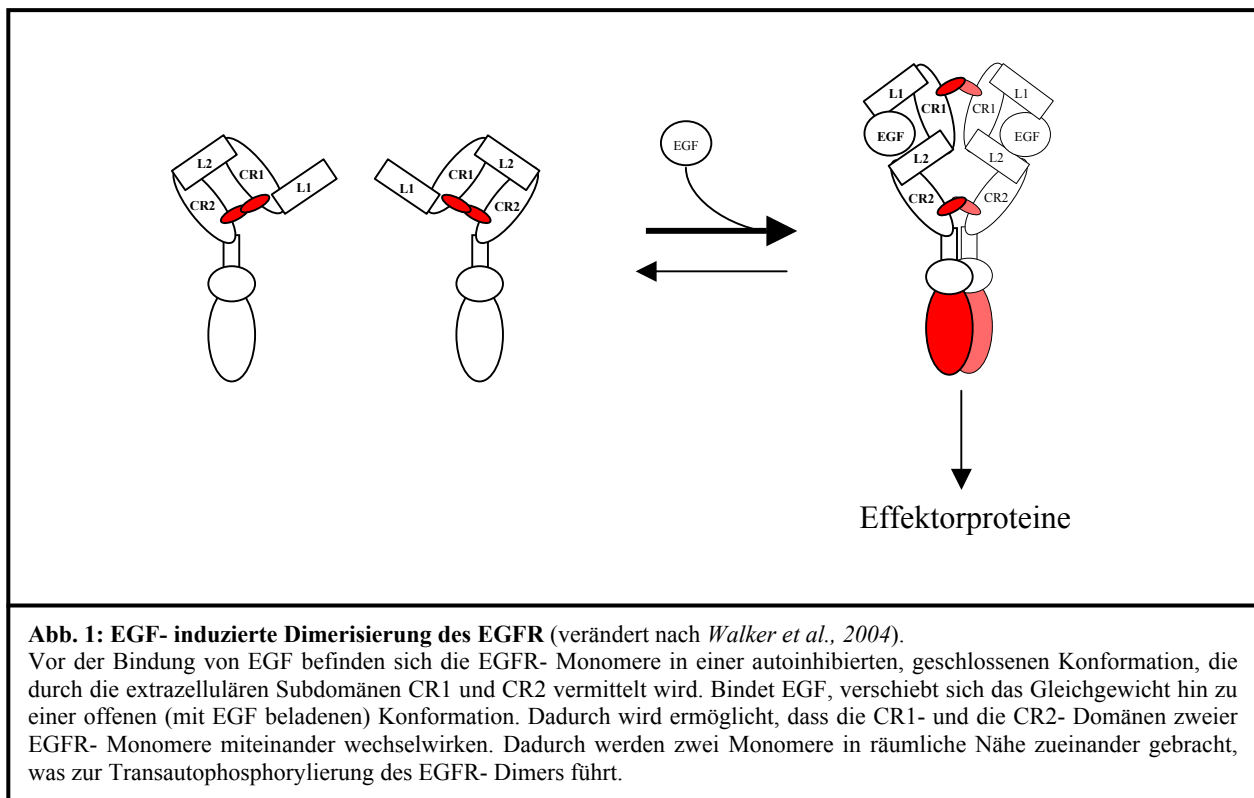
Bei der EGF- induzierten Dimerisierung kommt es zur Ausbildung eines 2:2- Liganden- Rezeptor-Komplexes (Lemmon et. al., 1997; Ogiso et al., 2002; Garrett et al. 2002). Strukturell ist die Ausbildung dieser Dimere ein komplexer Mechanismus und umfasst die Konformationsänderung der gesamten extrazellulären Domäne. Dadurch kommt es zu einer räumlichen Neuorientierung der cysteinreichen Subdomänen CR1 (mit der Dimerisierungsschleife) und CR2, sowie der Ligandenbindungsdomänen L1 und L2. Entscheidend für die Ausbildung der Rezeptordimere ist die extrazelluläre Subdomäne CR1, über die nur zwei mit EGF beladene Rezeptormonomere miteinander wechselwirken können (Ogiso et al., 2002; Garrett et al., 2002; Walker et al., 2004). Sind die Monomere nicht mit EGF beladen, wird deren Dimerisierung durch die intramolekulare Wechselwirkung zwischen der CR1- und der CR2- Domäne verhindert (Autoinhibition der Dimerisierung). Somit ist die CR1- Domäne maskiert und für die Dimerisierung unzugänglich.

Darüber hinaus wird durch die intramolekulare CR1/CR2- Wechselwirkung eine räumliche Distanzierung der Ligandbindungsdomänen L1 und L2 geschaffen. Dadurch kommt es zu einer Erniedrigung der Ligandenbindungsaffinität. Durch diesen Mechanismus wird eine EGF- unabhängige Wechselwirkung der Rezeptormonomere und deren spontane Transautophosphorylierung verhindert. Nach Bindung eines EGF- Liganden kommt es zu einer massiven Konformationsänderung und zur Öffnung der extrazellulären Domänen der Rezeptormonomere. Dabei wird die Dimerisierungsschleife CR1 durch die Aufhebung der CR1/CR2- Wechselwirkung freigelegt und die Ligandenbindungsdomänen L1 und L2 in enge Nachbarschaft zueinander gebracht (Ferguson et al., 2003). Durch die entstehende räumliche Annäherung von L1 und L2 wird die Ligandenbindungsaffinität erhöht. Weiterhin können die Rezeptormonomere über die freigelegten CR1- Domänen miteinander wechselwirken und die Autophosphorylierung vermitteln (Abb. 1) (Ogiso et al., 2002; Garrett et al., 2002; Schlessinger, 2002; Burgess et al., 2003; Ferguson et al., 2003; Mattoon et al., 2004; Walker et al., 2004).

Eine Ausnahme bei der Regulation der CR1- vermittelten Dimerisierung bildet ErbB2, da dieser ohne vorherige Ligandenbindung die Ausbildung von aktivierten Homo- bzw. Heterodimeren ermöglichen kann. Dies wird durch die konstitutiv- geöffnete Konformation des Rezeptors ermöglicht, in der die Dimerisierungsschleife unmaskiert vorliegt. So kann der ErbB2- Rezeptor eine Konformationsänderung der Dimerisierungsschleifen anderer ErbB- Rezeptoren induzieren. Diese Eigenschaft macht ErbB2 zu einem bevorzugten Heterodimerisierungspartner anderer ErbB- Subtypen. Somit lässt sich möglicherweise die hohe Aktivität von Signalwegen erklären, die durch ErbB- Rezeptoren in ErbB2- überexprimierenden Tumoren induziert werden können.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang weiterhin, dass Heterodimerisierungsereignisse auch zwischen den anderen Mitgliedern der ErbB- Rezeptorfamilie, wie ErbB1, ErbB3 und ErbB4, möglich sind. Durch die Ausbildung von Heterodimeren kann es neben der Beeinflussung der Affinität vom Rezeptor zum Liganden auch zur Beeinflussung der Ligand- induzierten Signalwege kommen. Diese Prozesse sind als Transmodulation bekannt und werden vor allem durch Phosphorylierungsprozesse vermittelt (King et al., 1988; Stern and Kamps, 1988; Wada et al., 1990; Huang et al., 1998; Schaefer et al., 1999; Ferguson et al., 2000; Schlessinger 2000a).

Es wird immer deutlicher, dass die Regulation der Dimerisierung ein komplexer Prozess ist. Mutationen oder die Überexpression solcher Rezeptoren können zur Deregulation der von ihnen vermittelten Signalwege führen und so die zelluläre Transformation und letztendlich die Tumorentstehung fördern.



### 1.2.3. Die Kinasedomäne des EGFR und deren Regulation

Bei der Regulation der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR spielen, im Gegensatz zu anderen Rezeptor-tyrosinkinasen, sowohl die Aktivierungsschleife als auch die dort vorkommenden Tyrosinreste keine Rolle. Dabei ist die Position eines Tyrosinrestes in der Aktivierungsschleife innerhalb der Familie der Tyrosinkinasen hoch- konserviert. Der entsprechende Tyrosinrest im EGFR ist Y845. Eine Deletion der Aktivierungsschleife oder die Mutation von EGFR- Y845 zu EGFR- F845 hat jedoch keine Auswirkung auf EGF- induzierte Signalwege (Gotoh et al., 1992; Tice et al., 1999; Burgess et al., 2003; Biscardi et al. 1999b). Dieses Phänomen wird durch die Stellung der Aktivierungsschleife im nicht stimulierten EGFR hervorgerufen. Wie gezeigt werden konnte befindet sich die Aktivierungsschleife im inaktiven wie auch im aktiven EGFR außerhalb der Substratbindungsstelle (Stamos et al., 2002). Somit nimmt die Aktivierungsschleife im inaktiven EGFR- Monomer eine Konformation ein, die bei anderen Rezeptortyrosinkinasen normalerweise nur dann vorliegt, wenn die Aktivierungsschleife durch die Kinasedomäne autophosphoryliert wurde. Die Aktivierungsschleife sowie EGFR- Y845 sind demnach vor und nach einer Ligandenbindung in unveränderter Position außerhalb der Kinasedomäne lokalisiert. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass EGFR- Y845 nicht als Autophosphorylierungsstelle des Rezeptors, sondern als c- Src spezifische Phosphorylierungsstelle identifiziert werden konnte (Sato et al., 1995a; Biscardi et al., 1999b).

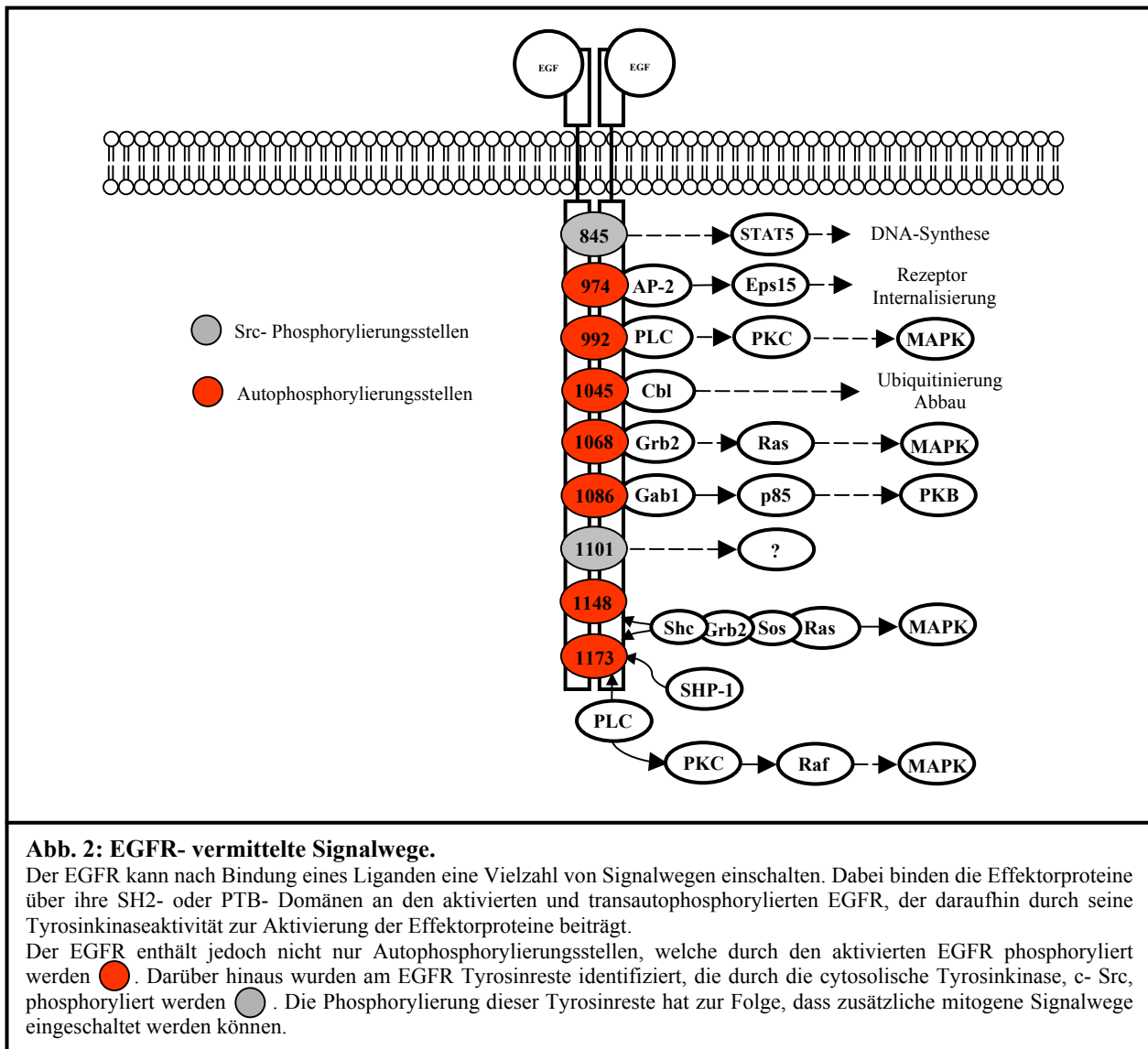
Diese Eigenschaften lassen die Vermutung zu, dass die Tyrosinkinasedomäne der EGFR- Monomere ohne vorherige Ligand- induzierte Dimerisierung in einer konstitutiv- aktivierten Konformation vorliegen könnte (Stamos et al., 2002; Burgess et al., 2003).

Die Wechselwirkung der Rezeptormonomere mit EGF scheint demnach nicht zur Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne, sondern der räumlichen Annäherung von zwei präaktivierten EGFR-Monomeren zu dienen (Burgess et al., 2003). Daraus erklärt sich, warum gerade ErbB1, ErbB2, ErbB3 und ErbB4 im Vergleich zu anderen Rezeptortyrosinkinasen sehr oft an zellulären Transformationen beteiligt sind. Die Regulation der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR kann auch über intrazellulär gelegene regulatorische Serin- und Threoninreste im C- Terminus des Rezeptors erfolgen. So kann der EGFR durch Proteinkinasen C (PKCs) (Hunter et al., 1984; Davis, 1988), die Proteinkinase A (PKA) (Barbier et al. 1999), Cdc2 (Kuppuswamy et al., 1993), die CaM- Kinase II (Countaway et al., 1992; Feinmesser et al., 1999), sowie durch ERK1/2 (Northwood et al., 1991; Takishima et al., 1991) phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierungsprozesse haben zur Folge, dass die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR herabgesetzt wird. Eine andere Möglichkeit der Regulation vermitteln Protein- Tyrosin- Phosphatasen (PTPs), die nicht die Aktivität des Rezeptors selbst, sondern vielmehr die Signalwege des Rezeptors über Dephosphorylierungen der Transautophosphorylierungsstellen negativ beeinflussen können (Bräutigam et al., 1981; Faure et al., 1992; Tenev et al., 1997; Keilhack et al., 1998). Diese Beispiele zeigen, dass der EGFR durch vielfältige Signale reguliert und in seinen Aktivitäten moduliert werden kann. Diese Vielfalt bedingt, dass sich positiv und negativ wirkende Mechanismen bei der Regulierung der Aktivität von Rezeptortyrosinkinasen gegenseitig beeinflussen können.

#### 1.2.4. Die Autophosphorylierungsstellen des EGFR

Die Dimerisierung der EGFR- Monomere führt durch die anschließende Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste im C- Terminus des Rezeptors zur Schaffung von Andockstellen für eine Vielzahl von Signalproteinen. Damit dienen die phosphorylierten Tyrosinreste [Y974 (pY974), Y992 (pY992), Y1045 (pY1045), Y1068 (pY1068), Y1086 (pY1086), Y1148 (pY1148), Y1173 (pY1173)] zur Aktivierung bestimmter Signalwege (Abb.2). pY992 und pY1173 dienen hauptsächlich als Andockstellen für die PLC $\gamma$ 1, welche nach ihrer Aktivierung durch den Rezeptor die „second messenger“ IP $_x$  und DAG freisetzt. Daraufhin können verschiedene PKC- Isoformen aktiviert werden, die dann entweder Ras- unabhängig ERK1/2 aktivieren oder über einen negativen Feedback-Mechanismus die Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors downregulieren. Über die Tyrosinreste pY1068, pY1086 und pY1148 kann es zu einer Ras- abhängigen Aktivierung von ERK1/2 kommen. Dabei bindet Grb2 direkt an pY1068 oder pY1086. Mit pY1148 hingegen können Shc- Proteine wechselwirken, was die Ausbildung des Grb2/Sos- Komplexes und die Ras- abhängige Aktivierung von ERK1/2 zur Folge hat. Weiterhin kann das Dockingprotein Gab1 an pY1068 und pY1086 binden. Dies führt entweder über Grb2 zur Aktivierung von ERK1/2 und/oder zur PI3K- vermittelten Aktivierung des PKB/Akt Signalweges. Neben den Autophosphorylierungsstellen am EGFR gibt es auch eine Reihe von Tyrosinresten, die nicht vom Rezeptor selbst phosphoryliert werden. Dazu gehören EGFR- Y845, EGFR- Y1101 (Biscardi et al., 1999b), EGFR- Y820 und EGFR- Y891 (Stover et al., 1995).

Die Funktion dieser Tyrosinreste ist jedoch weitgehend unklar. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass speziell EGFR- Y845 an der Src- abhängigen Stimulierung der DNA- Synthese über STAT- Proteine beteiligt ist (Kloth et al., 2003).



### 1.2.5. Signalweiterleitung des aktivierten EGFR

Vorraussetzung für die Aktivierung von bestimmten Signalwegen ist die Wechselwirkung zwischen den phosphorylierten Tyrosinresten des EGFR und den SH2- (Src Homology 2) bzw. PTB- (Phosphotyrosine Binding) Domänen verschiedener Effektorproteine. Dabei können an den auto-phosphorylierten EGFR Proteine ohne enzymatische Aktivität (wie die Adapterproteine Grb2, Nck, Crk und Shc und die Dockingproteine Gab1/2) und Proteine mit enzymatischer Aktivität (wie Src-Kinasen, Phosphatasen (PTP), Phospholipasen (PLC $\gamma$ ) und Ras- GAPs (GAP: GTPase Activating Protein) binden. Adapterproteine und auch Dockingproteine haben dabei die Aufgabe, eine Plattform für die Rekrutierung von Signalproteinen an der Zellmembran zu schaffen. Auf diese Weise vermitteln solche Proteine die Verbindung zwischen dem aktivierten Rezeptor und verschiedenen Signalproteinen (Sun et al., 1993; Schlessinger, 1994; Pawson, 1995; Kouhara et al., 1997).

Eine Voraussetzung für die Aktivierung von Proteinen mit enzymatischer Aktivität ist die Wechselwirkung mit dem autophosphorylierten EGFR. Dadurch kann in den Effektorproteinen eine Konformationsänderung induziert werden, die eine Aufhebung der Autoinhibition und die Aktivierung des Effektorproteins hervorruft. Beispiele dafür sind die Aktivierung der cytosolischen Protein-Tyrosinkinase c-Src und die Bindung der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3-Kinasen.

Ein weiterer wichtiger Mechanismus, der für die Aktivierung von Proteinen mit enzymatischer Aktivität von entscheidender Bedeutung ist, ist die Rezeptor-vermittelte Tyrosinphosphorylierung. Dabei wird das Effektorprotein nach dem Andocken an den aktivierten und autophosphorylierten EGFR durch den Rezeptor an bestimmten Tyrosinresten phosphoryliert und somit aktiviert. Diese Beispiele machen deutlich, dass der Rezeptor über vielfältige Möglichkeiten verfügt, bestimmte Signalwege zu aktivieren und zu kontrollieren.

### 1.3. c-Src als typischer Vertreter der Src-Kinasefamilie

Src-Kinasen sind nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, die an intrazellulären Membranen assoziiert vorkommen und an einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Bisher sind neun Mitglieder der Src-Kinasefamilie identifiziert worden. Dazu gehören die ubiquitär vorkommenden Src-Kinasen c-Src, Yes, Fyn und Lyn, sowie die zellspezifisch exprimierten Kinasen Lck, Hck und Frg. Da die Funktion und Regulation von c-Src am besten charakterisiert ist, wird auf die anderen Mitglieder der Src-Kinasefamilie nicht näher eingegangen.

c-Src ist ein 66kDa großes Protein, das aus 7 Domänen aufgebaut ist. Bei diesen handelt es sich um die SH4-Domäne, die „unique“-Domäne, die SH2- und SH3-Domäne, die SH2-Kinase Linker-Domäne, die katalytisch aktive SH1-Domäne und die regulatorische Domäne. Jede dieser Domänen ist dabei hochspezialisiert und kann auf unterschiedliche Weise zur Regulation von c-Src beitragen.

Die SH4-Domäne dient der Verankerung von c-Src in der Zellmembran. Dies wird durch einen Myristoylanker realisiert, der c-Src in räumliche Nähe zu den Substraten bringt (Wilson et al., 1989). Die Aufgaben der „unique“-Domäne sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Man vermutet jedoch, dass diese Domäne zur Regulation der Aktivität und zur Vermittlung von spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen genutzt werden kann.

Dafür spricht zum einen das Vorhandensein verschiedener regulatorischer Phosphorylierungsstellen, wie des PKA-spezifischen Serinrestes 17 (S17) (Brown et al. 1996; Schmitt et al., 2002a; Abrahamsen et al., 2003) und zum anderen die hohe Individualität dieser Domäne innerhalb der Src-Kinasefamilie.

Die SH2- und SH3- Domänen dienen zur Regulation der Aktivität und der Vermittlung von Wechselwirkungen mit anderen Signalproteinen. Dabei spielt der Tyrosinrest 530 (Y530) im C- Terminus eine wichtige Rolle. Wird Y530 phosphoryliert (z.B. durch Csk vermittelt), hat dies eine intramolekulare Wechselwirkung zwischen der N- terminal gelegenen SH2- Domäne und pY530 zur Folge. Dadurch tritt der prolinreiche SH2- Kinase- Linker mit der SH3- Domäne in Wechselwirkung und wird gegen das Rückgrat der katalytischen SH1- Domäne gepresst. Dies führt zu einer Änderung der Konformation der Aktivierungsschleife, die sich daraufhin in das aktive Zentrum legt und die katalytische Aktivität von c- Src unterdrückt. Wird Y530 hingegen dephosphoryliert, hat dies die Aufhebung der intramolekularen inhibitorischen Wechselwirkungen und somit die Aktivierung von c- Src zur Folge.

Bei der Regulation der Aktivität von c- Src spielt darüber hinaus der Tyrosinrest 416 (Y416) eine wichtige Rolle. Y416 ist eine Autophosphorylierungsstelle und befindet sich auf der Aktivierungsschleife von c- Src. Im inaktiven Zustand von c- Src liegt die Aktivierungsschleife mit Y416 im aktiven Zentrum und blockiert somit die enzymatische Aktivität von c- Src. Wird Y416 autophosphoryliert, ändert sich die Konformation der Aktivierungsschleife, die sich daraufhin aus dem aktiven Zentrum herausbewegt und damit die vollständige Aktivierung der Kinasedomäne induziert. Dabei kann die Autophosphorylierung von Y416 unter anderem auch durch die Aufhebung der inhibitorischen Wechselwirkung zwischen Y530 und der SH2- Domäne hervorgerufen werden. Demzufolge spielt neben Y530 auch Y416 bei der Regulation der Aktivität der Kinasedomäne eine wichtige Rolle.

Durch den Aufbau von c- Src ergeben sich, neben der durch Phosphorylierungs- oder Dephosphorylierungsereignisse hervorgerufenen Aktivierung, eine Vielzahl weiterer Aktivierungsmöglichkeiten. Dazu gehören:

- die Dephosphorylierung von pY530 durch PTPs (Yamaguchi et al., 1996; Sicheri et al., 1997; Xu et al., 1997),
- die Verdrängung von pY530 aus dem pY530/SH2- Komplex durch Proteine mit phosphorylierten Tyrosinresten (Hubbard et al., 1998),
- die Verdrängung des SH2- Kinase- Linkers aus dem SH2- Kinase- Linker/SH3- Komplex durch Proteine mit SH3- Domänen oder prolinreiche Proteine (Hubbard et al., 1998),
- die Unterbrechung der inhibitorischen Wechselwirkung zwischen pY530 und der SH2- Domäne durch eine PKA- vermittelte Phosphorylierung des Serinrestes S17 (Schmitt et al., 2002a).

Aufgrund dieser vielen Möglichkeiten kann vermutet werden, dass c- Src über verschiedene Signalwege aktiviert werden kann.



### 1.3.1. Wechselwirkungen zwischen c- Src und dem EGFR

Die Rolle von c- Src bei der EGF- vermittelten Signaltransduktion ist in den letzten Jahren sehr stark in den Mittelpunkt des Interesses getreten, da in vielen Tumoren eine stark erhöhte Aktivität und/oder eine Überexpression dieser Kinase nachgewiesen werden konnte. Bei klinischen Studien konnte im Vergleich zu normalen Geweben gezeigt werden, dass bis zu 70% aller untersuchten Tumoren eine 50-fach erhöhte Aktivität von c- Src aufweisen. Wie sich jedoch in den letzten Jahren ebenfalls herausstellte, ist die alleinige Überexpression von c- Src für eine Transformation von normalen Zellen und für eine verstärkte Proliferation unzureichend (Shalloway et al., 1984; Luttrell et al., 1988; Maa et al., 1995). Erst wenn es zusätzlich zu einer Überexpression des EGFR kommt, sind die Bedingungen für eine verstärkte Proliferation erfüllt.

Dies ist dadurch erklärbar, dass erst die Koüberexpression des EGFR und von c- Src zu einer engen physikalischen Wechselwirkung beider Proteine führt (Sato et al., 1995b; Biscardi et al., 2000). Dadurch kommt es zu einer synergistischen Zunahme der EGF- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und der Shc- Proteine (Maa et al., 1995). Die Überexpression beider Proteine hat weiterhin das Auftreten zusätzlicher c- Src- spezifischer Tyrosinphosphorylierungen am EGFR zur Folge. Solch ein Tyrosinrest ist EGFR- Y845 (Maa et al., 1995; Biscardi et al., 1999a; Tice et al., 1999; Wu et al., 2002), dessen c- Src- abhängige Phosphorylierung zu einer STAT5b- vermittelten DNA- Synthese führen kann (Olayioye et al., 1998; Haskell et al, 2001; Kloth et al., 2003; Sato et al., 2003; Xi et al., 2003).

Somit kann vermutet werden, dass der EGFR unter diesen zellulären Bedingungen die DNA- Synthese und dadurch die Proliferation sowohl über die Aktivierung von ERK1/2 als auch über STAT5b induzieren kann. Dies führt zu einer synergistischen Zunahme der EGF- induzierten Proliferation (Maa et al., 1995; Haskell et al, 2001).

## **1.4. G- Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)**

Eine weitere wichtige Gruppe von Rezeptoren stellen die GPCRs dar. Diese Rezeptoren bestehen aus sieben transmembranalen Helices, die über extra- bzw. intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind. Die extrazellulären Schleifen sowie Teile der transmembranalen Helices dienen dabei der Ligandenbindung. Der Ort der Ligandenbindung und somit auch die Art der Aktivierung des Rezeptors ist stark von den Merkmalen der Liganden abhängig (Schwartz et al., 1996; Wess, 1997). GPCRs besitzen keine intrinsische Enzymaktivität, so dass die Signalweiterleitung nur durch Ligand- induzierte Konformationsänderungen im Rezeptor hervorgerufen wird. Dabei induzieren die Liganden in den Rezeptoren eine Stellungsänderung der transmembranalen Helices zueinander. So kommt es auf der intrazellulären Seite zur Konformationsänderung der cytosolischen Schleifen und zur Aktivierung der G- Proteine.

G- Proteine stellen eine große Gruppe von Proteinen dar, die an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt sind. Neben den kleinen, monomeren G- Proteinen der Ras- Familie gibt es die Gruppe der heterotrimeren G- Proteine, die insbesondere für die Signalweiterleitung von GPCRs wichtig sind. Die heterotrimeren G- Proteine sind aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ - Untereinheit zusammengesetzt. Die  $\beta$ - und die  $\gamma$ - Untereinheit bilden eine funktionelle dimere Einheit, die nicht auseinander dissoziieren kann und als  $\beta\gamma$ - Komplex bezeichnet wird. Die Einteilung der heterotrimeren G- Proteine erfolgt anhand der  $G_\alpha$ - Untereinheit in vier verschiedene Gruppen. Dazu gehören die  $G_s$ - Proteine, die  $G_i$ - Proteine, die  $G_q$ - Proteine sowie die  $G_{12}$ - und  $G_{13}$ - Proteine. Jede dieser vier Gruppen beinhaltet verschiedene Subtypen, von denen bisher allein für die  $\alpha$ - Untereinheit 20 verschiedene Genprodukte identifiziert werden konnten. Ähnlich verhält es sich mit den  $\beta$ - und den  $\gamma$ - Untereinheiten, von denen für die  $\beta$ - Untereinheit 6 und für die  $\gamma$ - Untereinheit 12 Genprodukte identifiziert wurden. Aufgrund dieser Vielfalt ist eine große Anzahl von Kombinationen möglich, aus denen eine sehr hohe Variabilität der Signalweiterleitung resultiert. Durch die Rezeptor- induzierte Aktivierung der G- Proteine wird in der  $G_\alpha$ - Untereinheit ein Guanin- Nukleotid- Austausch (GDP gegen GTP) induziert, woraufhin der  $\beta\gamma$ - Komplex von der  $G_\alpha$ - Untereinheit abdissoziiert. Die freigesetzte  $G_\alpha$ - Untereinheit und der  $\beta\gamma$ - Komplex können nun verschiedene downstream- Effektoren aktivieren. Die Abschaltung oder Abschwächung des Signals erfolgt durch die intrinsische GTPase Aktivität (G- Domäne) der  $G_\alpha$ - Untereinheit, die das gebundene GTP langsam zu GDP+P hydrolysiert. Dadurch wird die Reassoziierung der  $G_\alpha$ - Untereinheit mit dem  $\beta\gamma$ - Komplex gefördert.

#### 1.4.1. Die mitogene Signaltransduktion verschiedener G- Proteine

Die Signalweiterleitung durch G- Proteine ist sehr vielfältig und umfasst unter anderem die mitogene Signaltransduktion. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Untersuchung mitogener GPCR-vermittelter Signalwege liegt, werden nur die Signalwege näher betrachtet, die zur Aktivierung von ERK1/2 führen. Bei heterotrimeren G- Proteinen können sowohl die  $G_\alpha$ - Untereinheit als auch die  $\beta\gamma$ - Komplexe an diesen Signaltransduktionsprozessen beteiligt sein. Dies trifft insbesondere für die  $G_q$ - und die  $G_i$ - Proteine zu. Bei  $G_s$ - Proteinen hingegen ist die Funktion der  $\beta\gamma$ - Komplexe noch nicht ausreichend untersucht. Die Signaltransduktion, die über  $G_q$ - Proteine zur Aktivierung von ERK1/2 führt, kann sowohl Ras- unabhängig, als auch Ras- abhängig verlaufen (van Biesen et al., 1996; Post et al., 1996). Welche der Signalwege eingeschaltet werden, ist dabei zell- und GPCR- spezifisch. Kommt es über  $G_{\alpha q}$ - Proteine zur Aktivierung der PLC $\beta$ , so erfolgt die Aktivierung von ERK1/2 über einen Ras- unabhängigen Mechanismus, bei dem Raf über PKC- Isoformen aktiviert wird (Hawes et al., 1995). Erfolgt hingegen die Aktivierung von Pyk2, kommt es zu einer Src- abhängigen Transaktivierung des EGFR. Daraufhin bildet sich am EGFR der Shc/Grb2/Sos- Komplex aus, in Folge dessen es zur Ras- abhängigen Aktivierung von ERK1/2 kommt (Dikic et al., 1996; Rodriguez-Fernandez et al., 1996).

G<sub>i</sub>- Proteine vermitteln meist eine Ras- abhängige Aktivierung von ERK1/2. Dabei sind insbesondere die  $\beta\gamma$ - Komplexe wichtig (Crespo et al., 1994; Koch et al., 1994; Hawes et al., 1995), über die eine Reihe von Effektorproteinen aktiviert werden können. Dazu zählen hauptsächlich die PI3- Kinasen (Touhara et al., 1995; Okada et al., 1996; Lopez- Illasaca et al., 1997; Kurosu et al., 1997; Leopoldt et al., 1998; Graneß et al., 1998; Roche et al., 1998; Meier et al., 2000; Meier et al., 2000) und die PLC $\beta$ . Die Aktivierung der PI3- Kinasen und der PLC $\beta$  (über die Aktivierung von Pyk2) führt zu einer Aktivierung von c- Src (Ptasznik et al., 1995; Dikic et al., 1996; Luttrell et al., 1996), was die Transaktivierung des EGFR und/oder die Phosphorylierung der Shc- Adapterproteine zur Folge hat (Touhara et al., 1995; van Biesen et al., 1995). Anschließend findet eine Ras- abhängige Aktivierung von ERK1/2 statt (Crespo et al., 1994; Hawes et al., 1995).

#### 1.4.2. G<sub>s</sub>- Proteine

Ein weiterer wichtiger Vertreter der heterotrimeren G- Proteine ist das G<sub>s</sub>- Protein. Da in dieser Arbeit die G<sub>s</sub>- vermittelten mitogenen Signalwege im Mittelpunkt stehen, wird die Signaltransduktion dieser G- Proteine genauer betrachtet. Über G<sub>s</sub>- Proteine wird die Aktivität der Adenylatzyclasen reguliert. Dabei bewirken die G<sub>as</sub>- Untereinheiten die Aktivierung der Adenylatzyclase, welche daraufhin aus ATP zyklisches AMP (cAMP) produziert. Das cAMP kann zu einer PKA- abhängigen Hemmung (Graves et al., 1993; Burgering et al., 1993; Cook et al., 1993; Sevetson et al., 1993) oder Stimulierung (Vossler et al., 1997; Schmitt et al., 2000; Greenberg et al., 2001; Fujita et al., 2002) von mitogenen Signalwegen führen. Welche der Signalwege eingeschaltet werden, hängt dabei von verschiedenen cAMP- bindenden Proteinen, der Expression verschiedener Raf- Isoformen, sowie von der Art und der Stärke des Signals ab.

#### 1.4.3. cAMP- vermittelte Inhibition der MAP- Kinase (MAPK)

Die cAMP- vermittelte Inhibition des Ras/MAPK- Weges wird über die GTPase, Rap1 und die PKA reguliert. Dabei stehen beide Proteine im engen Kontakt zueinander und vermitteln ihre inhibitorische Wirkung downstream von Ras und upstream von Raf- 1 (Graves et al., 1993; Burgering et al., 1993; Cook et al., 1993; Sevetson et al., 1993). Die Expression von Rap1 ist dabei entscheidend.

Wird Rap1 exprimiert, erfolgt die Hemmung von Raf- 1 über einen Mechanismus, der von der PKA, von c- Src und von Rap1 abhängig ist. Dabei wird c- Src über die PKA- vermittelte Phosphorylierung des Serins 17 aktiviert. Anschließend kommt es zu einer c- Src- vermittelten Ausbildung eines Cbl/Crk/GEF- Komplexes, der letztendlich zur Aktivierung von Rap1 führt (Schmitt et al., 2002a). Rap1 kann jetzt an Raf- 1 binden (Schmitt et al., 2001). Dadurch wird Raf- 1 dem Ras/MAPK- Signalweg entzogen und die Aktivierung von ERK1/2 gehemmt (Cook et al., 1993; Altschuler et al., 1995).

Wird Rap1 nicht exprimiert, kommt es zur direkten Phosphorylierung von Raf- 1 durch die PKA (Schramm et al., 1994; Mischak et al., 1996; Zimmermann et al., 1999; Dhillon et al., 2002). Dies setzt die Affinität von Ras zu Raf- 1 herab und verhindert die Aktivierung von Raf- 1 durch Ras (Häfner et al., 1994; Mischak et al., 1996). Auf diese Weise werden Ras- abhängige Signale, die zur Aktivierung von ERK1/2 notwendig sind, auf der Ebene von Raf- 1 blockiert.

#### 1.4.4. cAMP- vermittelte Aktivierung der MAPK

Die cAMP- vermittelte Aktivierung von ERK1/2 ist erst in den letzten Jahren näher ins Blickfeld der Untersuchungen gerückt, da eine lange Zeit davon ausgegangen wurde, dass cAMP nur als Gegenspieler der Aktivierung von ERK1/2 dient. Erst in kürzlich veröffentlichten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des cAMP- Spiegels zellspezifisch auch als Initiator der Proliferation genutzt werden kann. Dies spiegelt sich in der cAMP- abhängigen Aktivierung von ERK1/2 wieder, die von der Expression der B- Raf abhängig ist. Die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt dabei PKA- und Rap1- abhängig (Wan et al., 1998) und ist größtenteils EGFR- und Ras unabhängig (Vossler et al., 1997; Verheijen et al., 1997).

B- Raf wird im Gegensatz zu Raf- 1 durch die Bindung mit Rap- 1 aktiviert (Vossler et al., 1997). So zeigen Zellen, die B- Raf exprimieren, eine cAMP- abhängige Aktivierung der MAP- Kinase (Vossler et al., 1997; Dugan et al., 1999). Interessant ist, dass auch bei diesem Mechanismen c- Src eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Kobierski et al., 1999; Lindquist et al., 2000; Crepieux et al., 2001). Es existieren noch eine Reihe anderer Möglichkeiten, die zu einer cAMP- vermittelten Aktivierung der MAP- Kinase führen und bei denen Src eine zentrale Rolle spielt. Welcher Signalweg letztendlich eingeschaltet wird, ist zellspezifisch und hängt darüber hinaus von den zellulären Gegebenheiten und von den verschiedenen Aktivierungsmöglichkeiten der c- Src ab (Schmitt et al., 2002b).

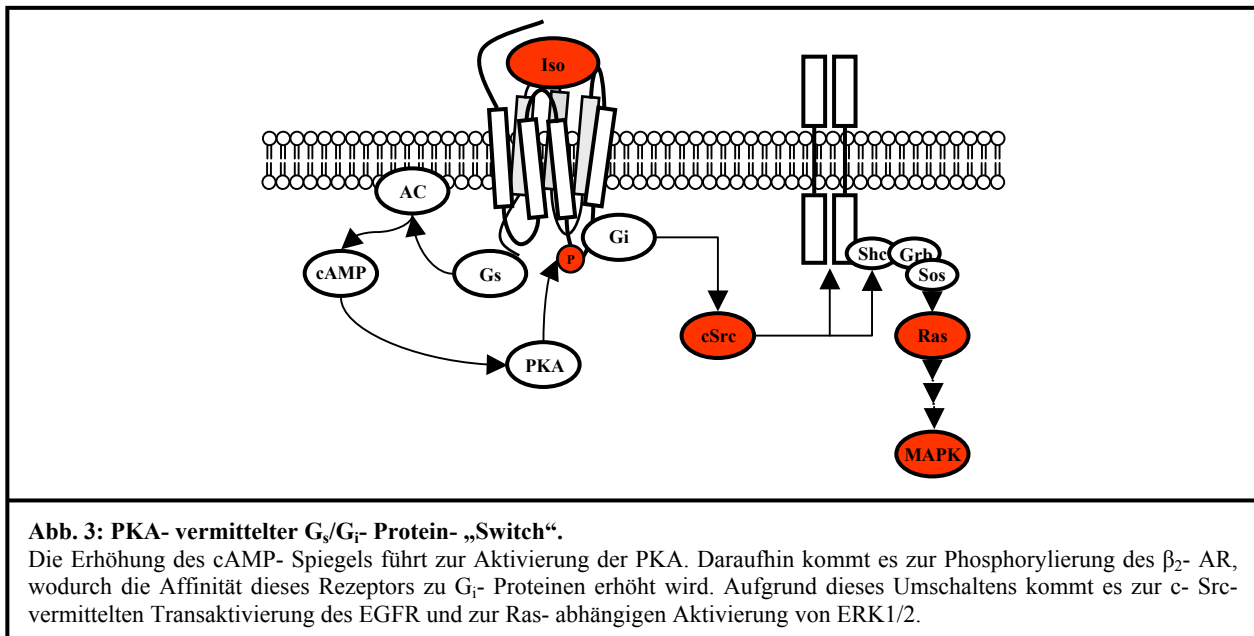
#### 1.4.5. Der $\beta_2$ - adrenerge Rezeptor

Ein typischer Vertreter von  $G_s$ - Protein- gekoppelten Rezeptoren ist der  $\beta_2$ - adrenerge Rezeptor ( $\beta_2$ - AR), der über cAMP ERK1/2 aktivieren kann. Dabei sind die mitogenen Signalwege, die durch den  $\beta_2$ - AR vermittelt werden können, sehr vielfältig und zellspezifisch. In der Literatur gibt es zum Teil große Widersprüche, die sich durch die Identifizierung verschiedener Isoprenalin\*- induzierter Signalwege in einer Zelllinie ergaben. So konnte in COS- 7- Zellen eine cAMP- abhängige (Faure et al., 1994) wie auch eine cAMP- unabhängige (Crespo et al., 1995) Aktivierung von ERK1/2 gefunden werden. Dabei postulierten Crespo et al. 1995 ein Gleichgewicht zwischen der  $\beta\gamma$ - Komplex- vermittelten Aktivierung und der  $G_s$ - vermittelten Inhibierung von ERK1/2. Je nachdem welcher der Signalwege bevorzugt aktiviert wird, kommt es entweder zu einer Hemmung oder einer Aktivierung von ERK1/2.

---

\* ein Derivat des Adrenalin

Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die Stimulierung von COS- 7- Zellen zu einer Src-abhängigen Transaktivierung des EGFR führt. Dadurch wird die Ausbildung eines Multi- Rezeptor-Komplexes, bestehend aus dem  $\beta_2$ - AR und dem EGFR, induziert (Maudsley et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit der Isoprenalin- vermittelten Signaltransduktion wurde durch Daaka et al., 1997 aufgeklärt. So konnte in HEK293- Zellen ein G- Protein- „Switch“ identifiziert werden, durch den der  $\beta_2$ - AR die Spezifität der G- Proteinkopplung kontrollieren kann (Abb. 3). Dabei vermittelt cAMP eine PKA- abhängige Phosphorylierung des  $\beta_2$ - AR. Diese führt zu einem Umschalten des Rezeptors von  $G_s$ - zu  $G_i$ - vermittelten Signalwegen (Zamah et al., 2002). Das hat zur Folge, dass der  $\beta_2$ - AR über  $\beta\gamma$ - Komplexe c- Src aktiviert. Daraufhin wird der EGFR transaktiviert und ERK1/2 Ras- abhängig aktiviert (Abb. 3). Im Unterschied dazu konnte in derselben Zelllinie eine Rap1- und B- Raf- abhängige Aktivierung von ERK1/2 identifiziert werden, bei der  $G_i$ - Proteine sowie Ras keine Rolle zu spielen scheinen (Schmitt et al., 2000).



Eine weitere Ebene der Komplexität der Signaltransduktion, die durch den  $\beta_2$ - AR vermittelt werden kann, wurde durch die Arbeit von Schmitt et al., 2002b aufgezeigt. Darin wird beschrieben, dass der Mechanismus der c- Src- Aktivierung ausschlaggebend für die Vermittlung bestimmter Signalwege ist. Wird c- Src durch die PKA am Serin 17 phosphoryliert und damit aktiviert, führt dies zu einer Rap1- abhängigen, jedoch Ras- unabhängigen Aktivierung von ERK1/2. Kommt es hingegen zu einer  $\beta\gamma$ - Komplex- vermittelten Aktivierung von c- Src, erfolgt die Aktivierung von ERK1/2 Ras- abhängig. In anderen Arbeitsgruppen wurden zur Aufklärung der  $\beta_2$ - AR- vermittelten Signalwege molekulargenetische Ansätze gewählt. Dabei wurden Src- defiziente Zelllinien verwendet, die weder c- Src noch Fyn oder Yes exprimieren. So konnte in SYF- Zellen sowie in genetisch veränderten S49- Zellen festgestellt werden, dass für die  $\beta_2$ - AR- vermittelte Aktivierung von ERK1/2 Src- Kinasen nicht unbedingt notwendig sind (Wan et al., 1998; Huang et al., 2004).

Die Rolle von PI3- Kinasen bei der  $\beta_2$ - AR- vermittelten Aktivierung von ERK1/2 ist hingegen weniger gut untersucht. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass PI3- Kinasen auch hier eine wichtige Rolle spielen können. So wurde in Herz- Fibroblasten der Ratte gezeigt, dass PI3- Kinasen für die Isoprenalin- induzierten DNA- Synthese wichtig sind (Kim et al., 2002). Weiterhin wurde durch verschiedene Gruppen festgestellt, dass die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von  $G_i$ - Proteinen zu einer  $\beta\gamma$ - Komplex- vermittelten Aktivierung von PI3- Kinasen führen kann (Naga et al., 2001). Die genauen Zusammenhänge und die Funktion der PI3- Kinasen in  $\beta_2$ - AR- vermittelten Signalwegen sind hingegen nicht bekannt.

Wie diese Ausführungen zeigen, sind die Signalwege, die durch den  $\beta_2$ - AR vermittelt werden, äußerst komplex und vielseitig. Es steht jedoch außer Frage, dass der EGFR zellspezifisch bei der  $\beta_2$ - AR- vermittelten und Ras- abhängigen Aktivierung von ERK1/2 eine zentrale Rolle spielt.

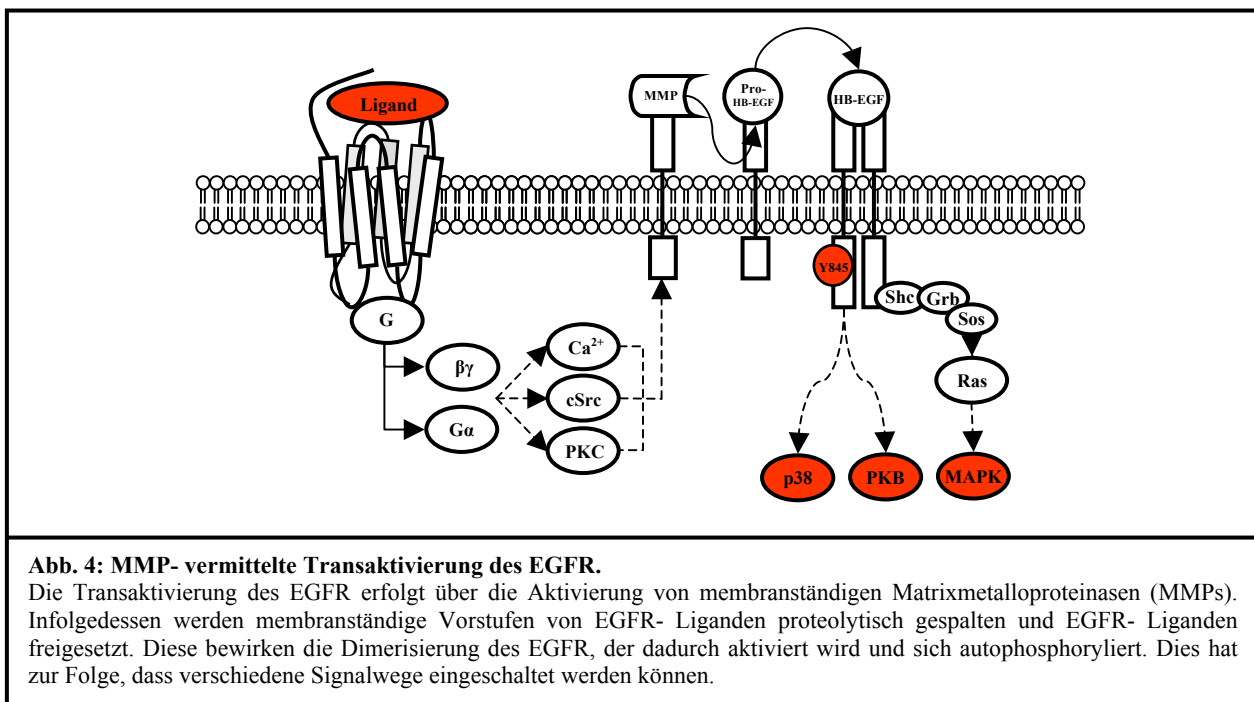
#### 1.4.6. EGFR- Transaktivierung

Die Transaktivierung des EGFR repräsentiert das Paradigma für den Crosstalk zwischen Rezeptortyrosinkinasen und GPCRs. Damit kann der EGFR als Integrationsprotein angesehen werden, das verschiedene Signale von verschiedenen Signalwegen verarbeiten und in eine zelluläre Antwort umsetzen kann. Wichtig ist, dass viele der GPCR- vermittelten Signalwege über die Transaktivierung des EGFR induziert werden können. Dabei wurde der EGFR in den meisten Arbeiten als Intermediat für die GPCR- vermittelte Aktivierung von ERK1/2 über den Ras- Raf- MEK- Signalweg untersucht. So konnte für eine Vielzahl von GPCRs, wie den Bradykinin-, den Angiotensin-, den M2- Rezeptor sowie den  $\beta_2$ - AR u.v.m., eine EGFR- abhängige Aktivierung von ERK1/2 nachgewiesen werden. Die Signalwege, die zur Transaktivierung des EGFR führen, können jedoch sehr verschieden sein. So kann die Transaktivierung über die GPCR- vermittelte Freisetzung von EGFR- Liganden induziert werden. Eine andere Möglichkeit besteht in der intrazellulären Vermittlung der Transaktivierung durch cytosolische Tyrosinkinasen ohne die Beteiligung von EGFR- Liganden (Daaka, 2002; Sabri et al., 2002; Buchanan et al., 2003; Shah et al., 2005). Obwohl die Transaktivierung über diese zwei Signalwege möglich ist, wird in beiden Fällen die Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR induziert (zusammengefasst in: Geschwind et al., 2001; Kraus et al., 2003).

Die Transaktivierung über die Freisetzung von EGFR- Liganden wird dabei als „Triple Membrane Passing Signalpathway“ (TMPS) bezeichnet. Dabei wird die Transaktivierung über die Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) vermittelt, die EGFR- Liganden aus membranständigen EGF- ähnlichen Wachstumsfaktor- Vorstufen freisetzen (Prenzel et al., 1999) (Abb. 4). Über die Signalwege, die zur GPCR- vermittelten Aktivierung der MMPs und damit zur Freisetzung der EGFR- Liganden führen, ist relativ wenig bekannt. Aber auch hier scheinen Src- Kinasen,  $Ca^{2+}$ - (Eguchi et al., 2001) und/oder auch PKC- abhängige (Shah et al., 2003a; Shah et al., 2003b) Signalwege involviert zu sein (Geschwind et al., 2001). Durch die freigesetzten EGFR- Liganden wird die Aktivierung und auch die Transautophosphorylierung des EGFR vermittelt (Prenzel et al., 1999).

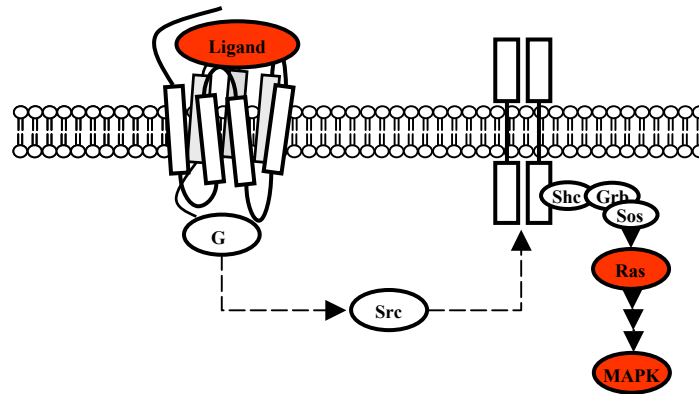
Die TMPS- vermittelte Transaktivierung konnte bisher für eine Reihe von Rezeptoren und in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden (Fitzgerald et al., 2000; Gschwind et al., 2003; McCole et al., 2002; Pai et al., 2002; Hart et al., 2004). Dabei konnte gezeigt werden, dass durch diese Form der Transaktivierung eine Reihe von Signalwegen downstream des EGFR eingeschaltet wird. So wurde gezeigt, dass c- Src, der PI3K/PKB- Signalweg (Hart et al., 2004) wie auch die p38 (Eguchi et al., 2001) downstream des transaktivierten EGFR aktiviert werden können.

Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die GPCR- vermittelte Freisetzung von EGFR- Liganden auch zur Phosphorylierung des Src- spezifischen Tyrosinrestes Y845 am EGFR führen kann. So konnte durch die Stimulierung verschiedener Zelllinien mit LPA (Santiskulvong et al., 2003), Endothelin (Haskell et al., 2001) und Gonadotropin (Roelle et al., 2003) eine MMP- abhängige Phosphorylierung von EGFR- Y845 gefunden werden. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die MMP- abhängige Transaktivierung des EGFR zur Aktivierung einer Vielzahl von Signalwegen downstream des EGFR führen kann (Abb. 4).



Die Transaktivierung über intrazelluläre Signalwege hat ebenfalls die Aktivierung des EGFR zur Folge. Der Unterschied zur EGFR- Ligand- vermittelten Transaktivierung scheint jedoch darin zu bestehen, dass die Aktivierung des EGFR direkt durch Src- Kinasen vermittelt wird (Sabri et al., 2002; Buchanan et al., 2003; Shah et al., 2005) (Abb. 5).

Auch durch diese Form der Transaktivierung können zellspezifisch downstream des EGFR eine Reihe von Signalwegen eingeschaltet werden. Dazu zählen die Ras- abhängige Aktivierung von ERK1/2, die Aktivierung der PKB/Akt und von p38 (Sabri et al., 2002; Buchanan et al., 2003; Shah et al., 2005). Wie diese Übersicht deutlich macht, kann auch durch diese Form der Transaktivierung die Einschaltung verschiedener Signalwege reguliert werden (Abb. 5).



**Abb. 5: MMP- unabhängige Transaktivierung des EGFR.**

Die Transaktivierung des EGFR erfolgt auf intrazellulärem Weg durch cytosolische Src- Kinasen. Dadurch kommt es zur direkten Phosphorylierung und Aktivierung des EGFR und es werden verschiedene Signalkaskaden, wie der Ras/Raf/MEK/MAPK- Weg, eingeschaltet.



## 2. Zielstellung

In vielen Arbeiten wurde beschrieben, dass die GPCR- vermittelte Transaktivierung des EGFR ein weit verbreiteter Mechanismus ist. Dabei dient der aktivierte EGFR als intermediäres Scaffold- und Integrationsprotein.

Die Transaktivierung kann sowohl über die Freisetzung von EGFR- Liganden als auch auf intrazellulären Signalwegen erfolgen. Daher kann vermutet werden, dass das Einschalten bestimmter GPCR- vermittelter und EGFR- abhängiger Signalwege auch durch den Mechanismus, über den die Transaktivierung erfolgt, reguliert werden kann. Dies lässt vermuten, dass die Ligand- abhängige und Ligand- unabhängige Transaktivierung unterschiedliche Transaktivierungsmuster am EGFR induzieren, die dazu führen, dass nur ganz bestimmte Signalwege vermittelt werden können.

Diese These war Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. Im ersten Teil wurde die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung des EGFR untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass diese im Gegensatz zur LPA- induzierten Transaktivierung des EGFR unabhängig von MMPs vermittelt wird. Aufgrund dieses Ergebnisses sollte dann geklärt werden, welche zusätzlichen EGFR- abhängigen Signalwege, neben der Aktivierung von ERK1/2, durch Isoprenalin und LPA aktiviert werden können.

Durch den fehlenden Einfluss der MMPs bei der Isoprenalin- induzierten Transaktivierung wurde im zweiten Abschnitt untersucht, ob durch die Erhöhung der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR die fehlende Freisetzung von EGFR- Liganden simuliert werden kann.

Der dritte Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Abhängigkeit GPCR- und EGF- vermittelter Signalwege von verschiedenen Src- Isoformen. Weiterhin sollte die EGF- induzierte und c- Src spezifische Phosphorylierung von EGFR- Y845 näher untersucht werden. Ausgangspunkt hierfür waren Arbeiten, die EGFR- Y845 als einen Tyrosinrest beschreiben, der in EGFR- und c- Src- überexprimierenden Zellen c- Src- abhängig phosphoryliert wird (Biscardi et al., 1999b; Tice et al., 1999; Sato et al., 2003). In dieser Arbeit sollte hingegen untersucht werden, ob dies auch auf Zellen zutrifft, die c- Src und den EGFR nicht überexprimieren.

### 3. Material und Methoden

#### Antikörper

- anti- PLC $\gamma$ 1	polyklonal, Kaninchen ( <b>Santa Cruz</b> )
- anti- PKC $\epsilon$	polyklonal, Kaninchen ( <b>Santa Cruz</b> )
- anti- PKC $\beta$ I	polyklonal, Kaninchen ( <b>Santa Cruz</b> )
- 13G8 (anti- EGFR)	monoklonal, Maus ( <b>Nanotools</b> )
- 12A3 (anti- pY845- EGFR)	monoklonal, Maus ( <b>Nanotools</b> )
- 9H2 (anti- pY1173- EGFR)	monoklonal, Maus ( <b>Nanotools</b> )
- Mab425 (anti- EGFR)	monoklonal, Maus ( <b>Merck</b> )
- 4G10 (anti- Phosphotyrosin)	monoklonal, Maus (Prof. Pressek, Halle)
- Mab327 (anti- c- Src)	monoklonal, Maus (Prof. Pressek, Halle)
- anti- Fyn3	polyklonal, Kaninchen ( <b>Santa Cruz</b> )
- anti- pS473 der PKB/Akt	polyklonal, Kaninchen ( <b>Cell Signalling</b> )
- anti- PKB/Akt	polyklonal, Kaninchen ( <b>Pharmingen</b> )
- anti- ERK1	polyklonal, Kaninchen ( <b>Santa Cruz</b> )
- anti- ERK2	polyklonal, Kaninchen ( <b>Santa Cruz</b> )
- anti- pan- Ras	monoklonal, Maus ( <b>Oncogene</b> )
- Ziege- anti- Maus- IgG- HRP	( <b>Santa Cruz</b> )
- Ziege- anti- Kaninchen- IgG- HRP	( <b>Santa Cruz</b> )

#### Puffer und Lösungen

##### PBS- Puffer (pH 7,4) für Transfektion

- 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (**ROTH**)
- 2,7mM KCl (**ROTH**)
- 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (**ROTH**)
- 0,14M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (**ROTH**)

##### Lysispuffer

- 20mM HEPES (pH 7,5) (**Sigma**)
- 1% (v/v) Triton X- 100 (**Sigma**)
- 2,5mM MgCl<sub>2</sub> (**Sigma**)
- 10mM EGTA (**Sigma**)
- 1mM DTT (**Sigma**)
- 40mM  $\beta$ - Glycerophosphat (**Sigma**)

##### PBS- Puffer (pH 7,4) für Immunopräzipitation

- 25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O (**Sigma**)
- 80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O (**ROTH**)
- 100mM NaCl (**ROTH**)
- 1% Triton X- 100 (**Sigma**)
- 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (**Sigma**); vor Zugabe abgekocht

- 20 $\mu$ g/ml Aprotinin (**Sigma**)
- 20 $\mu$ g/ml Leupeptin (**Sigma**)
- 1mM PMSF (**Serva**)
- 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (**Sigma**); vor Zugabe abgekocht

Probenpuffer (SDS- PP)

- 30% (v/v) einer 0,7M SDS- Lsg. (**Sigma**)
- 30% Mercaptoethanol (**Sigma**)
- 40% Glycin (**ROTH**)
- Bromphenolbau (**Serva**)

Obergelpuffer (pH 6,8) (OGP)

- 0,5M Tris (**ROTH**)

Anodenpuffer

- 36,3g Tris (**ROTH**)
- 200ml Methanol (**ROTH**)
- 800ml Wasser

TBS- Puffer pH 7,6

- 10mM Tris- HCl (**ROTH**)
- 152mM NaCl (**ROTH**)

Strip- Puffer

- 2% (v/v) einer 20%igen SDS Lsg. (**Sigma**)
- 62,5mM Tris- HCl pH6,8
- 100mM Mercaptoethanol (**Sigma**)
- ad 100ml H<sub>2</sub>O

MAPK- Assay Reaktionspuffer (pH 7,5)

- 12,5mM MOPS (**ROTH**)
- 7,5mM MgCl<sub>2</sub> (**Sigma**)
- 0,5mM NaF (**Sigma**)
- 12,5mM Glycerophosphat (**Sigma**)
- 0,5mM EGTA, 0,5mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (**Sigma**)

Laufpuffer (1x)

- 25mM Tris (**ROTH**)
- 200mM Glycin (**ROTH**)
- 0,5% (v/v) einer 20%igen SDS- Lsg. (**Sigma**)

Trenngelpuffer (pH 8,8)

- 2M Tris (**ROTH**)

Kathodenpuffer

- 6,05g Tris (**ROTH**)
- 10,5g ε- Aminocaprinsäure (**Sigma**)
- 400ml Methanol (**ROTH**)
- 0,25% (v/v) einer 20%igen SDS- Lsg. (**Sigma**)
- 1600ml Wasser

TBST (TBS + Tween)

- TBS + 0,1% (v/v) Tween20 (**Sigma**)

MAPK- Assay- Waschpuffer (pH 7,5)

- 100mM Tris- HCl (**ROTH**)
- 0,5mM LiCl (**Sigma**)

**Puffer für die Bestimmung der Inositolphosphatfreisetzung****Waschpuffer**

- 60mM Ammoniumformat (**Sigma**)
- 5mM Natriumborat (**Sigma**)

**Elutionspuffer**

- 1M Ammoniumformat (**Sigma**)
- 0,1M Ameisensäure (**Sigma**)

**Regenerationspuffer**

- 2M Ammoniumformat (**Sigma**)

**Zelllinien**

- **COS- 7** (*Nierenzellen der grünen Meerkatze*), German Collection of Microorganisms and Cell Culture
- **SYF** (*embryonale Mausfibroblastenzellen*), zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Böhmer, Jena
- **SYF<sup>+</sup>** (*embryonale Mausfibroblastenzellen*), zur Verfügung gestellt von: Prof. Dr. Böhmer, Jena
- **A431** (*menschliche epidermoide Karzinomzellen*), German Collection of Microorganisms and Cell Culture
- **SH- SYSY** (*menschliche Neuroblastomzellen*), German Collection of Microorganisms and Cell Culture
- **MCF- 7** (*menschliche Mammaadenokarzinomzellen*), German Collection of Microorganisms and Cell Culture
- **H125** (*menschliche Lungen Karzinomzellen*), German Collection of Microorganisms and Cell Culture
- **SW-480** (*menschliche Dickdarm Adenocarcinomzellen*), German Collection of Microorganisms and Cell Culture

**Zellkultur**

- |   |  |
|---|--|
| - DMEM ( <b>PAA, Gibco</b> )                            | - Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen ( <b>Greiner</b> ) |
| 4,5g/l Glukose; mit Natriumpyruvat                      | - FKS (fötales Kälberserum) ( <b>PAA, Gibco</b> )          |
| L- Glutamin   | - Trypsin- EDTA- Lsg. ( <b>PAA, Gibco</b> )                |
| - Gentamycin (10mg/ml) ( <b>PAA, Gibco</b> )            | - DAE- Dextran ( <b>Sigma</b> )                            |
| - Antibiotika/Antimykotika (100x) ( <b>PAA, Gibco</b> ) |  |

**Inositolphosphatfreisetzung**

- Medium 199 (ohne Inositol) (**Gibco**)
- [ $^3\text{H}$ ] *myo*- Inositol (**NEN**)
- TCA (10%) (**Sigma**)
- Diethylether (**ROTH**)
- Tris- HCl (**ROTH**)
- Scintillationslsg. Flo Scint (**Packard**)
- AG 1x8, 200- 400 mesh form, volume 200 $\mu\text{l}$   
(Anionenaustauscher- Säulen) (**BIORAD**)

**Stimulierung der Zellen**

- EGF (**Calbiochem**)
- Isoprenalin (**Sigma**)
- LPA (**Sigma**)
- HB- EGF (**Calbiochem**)
- AG1478 (**Calbiochem**)
- AG490 (**Calbiochem**)
- DMSO (**ROTH**)
- AG825 (**Calbiochem**)
- PP2 (**Calbiochem**)
- H89 (**Calbiochem**)
- Bisindolylmaleimid (**Calbiochem**)
- GM6001 (**Calbiochem**)

**IP; SDS- PAGE; Immunoblot**

- Proteine- A- Sepharose (**Amersham; Sigma**)
- CL4B- Sepharose (**Sigma**)
- Acrylamid/Bisacrylamid (30%) (**ROTH**)
- APS und TEMED (**Sigma**)
- PVDF Hybond P Blotmembran (**Amersham**)
- Elektrophoresezubehör (**HÖFER**)
- Semidry- Blotsystem (**HÖFER**)
- BSA SERVA, (**Sigma**)
- Trockenmilch (**Lasana**)
- ECL (**Amersham**)
- Röntgenfilme (**Kodak**)
- Entwickler, Fixierer (**Kodak**)
- Mercaptoethanol (**Sigma**)

**MAPK- Assay**

- ATP (**Sigma**)
- [ $\gamma$   $^{32}\text{P}$ ] ATP (**NEN**)
- MBP (**Sigma**)

verwendete Vektorenverwendete Mengen (x µg/1,5 Mio. Zellen)- in **pcDNA3** war kodiert:

EGFR- Y845F (4µg)

EGFR- ΔCR1 (4µg)

CD8- βARK (1µg)

- in **pRK5** war kodiert:

EGFR- WT (0,6µg)

EGFR- Y1173F (0,6µg)

EGFR- Y992F (0,6µg)

Fyn- K299M (1µg)

- in **pcMVS** war kodiert:

dnSrc- K295R/Y527F (1µg)

c- Src- WT (1µg)

- in **pNRTIS- 21** war kodiert:

N17Ras (1µg)

Die c-DNAs für die Expression folgender Proteine wurden zur Verfügung gestellt von :

EGFR- WT

Prof. Dr. Böhmer (Jena)

EGFR- Y1173F

Prof. Dr. Böhmer (Jena)

EGFR- Y992F

Prof. Dr. Böhmer (Jena)

EGFR- Y845F

Dr. Sarah J. Parsons (Charlottesville)

EGFR- ΔCR1

Dr. Hong- Jian (Melbourne)

dnSrc (K295R/Y527F)

Dr. J. Brugge (Harvard)

Fyn- K299M

Dr. F. Giancotti (New York)

CD8- βARK

Dr. Gutkind (Bethesda)

N17Ras

Dr. I. Rubio (Jena)

### 3.1. Methoden

#### 3.1.1. Zellkultur

COS- 7-, A431- sowie SYF- und SYF<sup>+</sup> - Zellen wurden in DMEM- Medium, das mit 10% FKS und 1% Antibiotikamix oder Gentamicin versetzt war, bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Vor der Stimulierung wurden die Zellen über Nacht (18h) mit SFM behandelt, anschließend 5min stimuliert und danach lysiert. Um unlösliche Bestandteile der Zellen von den Lysaten abzutrennen, erfolgte die Zentrifugation der Lysate für 5min bei 14000U/min. Die so entstandenen Lysate wurden danach zum Teil aliquotiert und einem direkten Westernblot unterzogen. Die Aufbewahrung der restlichen Lysate erfolgte in allen Fällen bei -80°C.

#### 3.1.2. Transfektion mit DEAE- Dextran

Die transiente Transfektion erfolgte nach der DEAE- Dextran oder der Lipofectamin- Methode. Dabei wurden 1,5 Mio. Zellen pro 100mm Platte ausgesät und nach 24h mit den verschiedenen cDNA- Ansätzen transfiziert. Für die Transfektion nach der DEAE- Dextran- Methode erfolgte zunächst ein zweimaliges Waschen der Zellen mit 37°C- warmen PBS Puffer. Daran schloss sich eine 30- minütige Behandlung mit 600µl des jeweiligen Transfektionsmixes (cDNA; PBS; Dextran 10mg/ml) an, der anschließend mit 6ml SFM und 100µl 8mM Chloroquin aufgefüllt wurde. Nach 3 Stunden wurde das SFM mit dem Chloroquin abgesaugt und durch Vollmedium ersetzt. Die Zellen wurden damit 48h kultiviert und vor der Stimulierung über Nacht (18h) mit SFM behandelt. An die Stimulierung schloss sich die Lysierung der Zellen mit Lysispuffer an.

#### 3.1.3. Transfektion mit Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen)

24h nach der Aussaat der Zellen in 6- Well- Platten wurde das Medium zu DMEM+ FKS/Antibiotika (2ml/Well) gewechselt und mittels Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) laut Protokoll des Herstellers mit der entsprechenden Menge an cDNA transfiziert. Nach 48h erfolgte der Wechsel des Medium zu SFM (18h) und die anschließende Stimulierung der Zellen.

#### 3.1.4. Immunopräzipitation

Die Lysate wurden mit dem jeweiligen Antikörper (2h) und Protein- A Sepharose (1h) behandelt (alle Schritte erfolgten auf einem Drehrad bei 4°C). Danach wurden die Ansätze zentrifugiert (1min bei 14000U/min), der Überstand abgesaugt und die Pellets dreimal mit PBS- Puffer (PBS; 1%Triton; 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) gewaschen. Anschließend wurde der PBS- Puffer vollständig abgesaugt und die Pellets mit 60µl- 100µl Auftragspuffer (1:1 mit OGP verdünnt) versetzt und 5min abgekocht. Die Proben auf 10min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (1min bei 14000U/min). Der Überstand wurde abgenommen und für weitere Aufarbeitungsschritte bei -20°C eingefroren.

### 3.1.5. MAPK- Assay

Der MAPK- Assay dient als ein *in vitro* Nachweis der Aktivität von ERK1/2 nach vorheriger Stimulierung und Lysis der Zellen. Die Lysate wurden einer Immunopräzipitation mit einem ERK1-spezifischen Antikörper (1µg/Probe) unterzogen (weiterer Ablauf: siehe Abschnitt „Immunopräzipitation“). Nach Abschluss der Immunopräzipitation wurden die Pellets mehrfach mit unterschiedlichen Puffersystemen gewaschen. Dabei erfolgten die ersten drei Waschschrte mit PBS-Puffer. Daran schloss sich dann das jeweils einmalige Waschen der Ansätze mit Tris- Puffer und Kinase- Reaktionspuffer an. Anschließend wurde auf die Sepharosepellets der 30µl Reaktionsansatz (1µCi [ $\gamma$ -  $^{32}$ P]- ATP; 20µM „kaltes“ ATP, 1,5mg/ml MBP; 3,3mM DTT und der Kinase-Reaktionspuffer) gegeben, die Ansätze kurz gevortext und 20min bei 30°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von SDS- PP (30µl) und Abkochen (5min bei 95°C) gestoppt. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt (10min) und danach der Überstand abzentrifugiert (1min bei 14000U/min). Es folgte dann die Abnahme des Überstandes und die Auftrennung der Proben mittels SDS- PAGE (13%). Die Gele wurden geteilt, wobei der untere Teil des Gels zum Nachweis des radioaktiv markierten MBP und der obere Teil zum Nachweis von ERK1/2 diente. Dabei wurde der obere Teil fixiert und auf einem Geltrockner getrocknet (bei 50-70°C), während der untere Teil einem Westernblot unterzogen wurde.

### 3.1.6. SDS- PAGE

Mit dieser Methode können Proteine durch die Zugabe von SDS zu den Proben und in das Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Dichte der Gele wird durch den Acrylamidgehalt variiert und je nach Experiment und Größe des zu untersuchenden Proteins ausgewählt. So wurde für den Nachweis des EGFR, der PLC $\gamma$ 1, der PKB/Akt und von ERK1/2 10%ige Polyacrylamid- Gele und für die MAPK- Assays 13%ige Polyacrylamid- Gele verwendet. Vor dem Auftragen wurden die Proben, die zuvor mit SDS- Auftragspuffer (siehe „Immunopräzipitation“) behandelt wurden, 5min bei 95°C abgekocht und 5min zur Abkühlung auf Eis gestellt. Wurde eine Immunopräzipitation durchgeführt, mussten die Proben zur Entfernung der Proteinsepharose- A zentrifugiert werden (1min bei 14000U/min), bevor sie auf das Gel aufgetragen werden konnten. Die Gelelektrophorese erfolgte mit einer Spannung von max. 150V und einer Stromstärke von max. 22mA/Gel.

### 3.1.7. Westernblot (Semi- Dry- Technik)

Der Westernblot diente dazu, die Proteine, die durch die SDS- PAGE aufgetrennt wurden, auf eine PVDF- Membran zu blotten. Dabei erfolgte der Westernblot bei max. 12V und einer Stromstärke, die sich nach der Fläche des zu blottenden Gels richtete (Fläche der Membran in cm<sup>2</sup> x 0,8mA). Anschließend wurde die PVDF- Membran mit einer Blocklösung behandelt, deren Zusammensetzung sich nach dem Antikörper richtete, der zum Nachweis des Proteins diente.



### 3.1.8. Immunologischer Nachweis der Proteine

Der Nachweis der Proteine erfolgte mit spezifischen primären und mit HRP- gekoppelten, sekundären Antikörpern und der Visualisierung der Proteine mit ECL. Nach dem Blotten wurden die PVDF- Membranen über Nacht mit einer Blocklösung behandelt. Deren Zusammensetzung richtete sich nach dem verwendeten primären Antikörper. Sollten die Membranen mit einem monoklonalen Antikörper inkubiert werden, so erfolgte das Blocken mit einer 1%igen BSA- Lösung in TBS. Wurde hingegen ein polyklonaler Antikörper verwendet, wurde eine 5%ige Trockenmilchlösung in TBS verwendet. Danach wurden die PVDF- Membranen viermal 5min mit TBST gewaschen. Daran schloss sich die Behandlung der Membranen mit dem primären Antikörper an. Monoklonale Antikörper wurden in einer 1%igen BSA- Lsg. (in TBST) und polyklonale Antikörper in einer 2%igen oder 5%igen Trockenmilchlösung (in TBST) verdünnt. Die Inkubationszeit betrug 1h. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte das erneute Waschen der Membranen (viermal 5 min) mit TBST. Anschließend wurden die Membranen mit dem sekundären Antikörper behandelt. Dabei richtete sich die Wahl des sekundären Antikörpers nach dem verwendeten primären Antikörper. So wurde entweder ein anti- Maus- oder ein anti- Kaninchen- Antikörper verwendet, die zusätzlich mit der HRP gekoppelt waren. Auch hier richteten sich die Ansätze nach dem verwendeten Antikörper. Der anti- Maus- Antikörper wurde in einer 1%igen BSA- Lsg. (in TBST) und der anti- Kaninchen- Antikörper in einer 2%igen oder 5%igen TM- Lösung (in TBST) verdünnt. Bevor die PVDF- Membranen mit dem ECL behandelt wurden, wurden die Membranen wiederum viermal 5min mit TBST- Puffer gewaschen. Anschließend folgte dann die Visualisierung des zu untersuchenden Proteins mit ECL und einem Röntgenfilm.

**Ausnahmen:** Nachweis von pS473 PKB/Akt und von p44/p42 MAPK (Thr202/Tyr204)

Dazu wurde der polyklonale pS473 PKB/Akt spezifische Antikörper und der monoklonale p44/p42 MAPK (Thr202/Tyr204) 3A7 Antikörper verwendet. Das Blocken der Membranen zum Nachweis von pS473 PKB/Akt erfolgte 3h in einer 5%igen BSA- Lsg. (in TBST) und zum Nachweis der p44/p42 MAPK (Thr202/Tyr204) 3h in einer 5%igen Trockenmilchlsg (in TBST). Die Inkubation der primären Antikörper wurde über Nacht bei 4°C durchgeführt. Das Waschen erfolgte viermal mit TBST. Anschließend wurden die Membranen 1h mit dem anti- Kaninchen- (für pS473 PKB/Akt) oder dem anti- Maus- (für p44/p42) Antikörper inkubiert. Dabei wurde der anti- Kaninchen- Antikörper in einer 5%igen BSA- Lsg. (in TBST) und der anti- Maus- Antikörper in einer in einer 5%igen Trockenmilchlsg. (in TBST) aufgenommen. Die Visualisierung erfolgte ebenfalls mit ECL und Röntgenfilmen.

### 3.1.9. Inositolphosphatbestimmung

Die Gesamtinositolphosphatbestimmung erfolgte nach dem Protokoll von Tilly et al. 1987. Dazu wurden COS- 7- Zellen in 24- Well Platten ausgesät ( $10^5$  Zellen/Well). Nach 24h erfolgte die Behandlung der Zellen mit inositolfreiem DMEM- Minusmedium (DMEM 199) und die Markierung

mit 4µCi/Well [<sup>3</sup>H] *myo*- Inositol für weitere 24h. Zwei Stunden vor der Stimulierung der Zellen wurde das Minusmedium gegen 20mM HEPES (pH7,4) gepuffertes serumfreies DMEM (SFM) ausgetauscht. Danach wurden die Zellen 15min mit 10mM LiCl (Endkonzentration) bei 37°C behandelt und anschließend nach Protokoll stimuliert. Nach der Stimulierung wurden das Medium abgesaugt und durch 1ml 10%iger Trichloressigsäure ersetzt. Nach 10min Inkubationszeit wurden die Proben in Reagenzgläser überführt und dreimal mit wassergesättigtem Diethylether gewaschen. Die mehrfach gewaschene wässrige Phase wurde anschließend mit 3M Tris- Lsg. neutralisiert und auf Anionenaustauscher- Säulen aufgetragen. Anschließend wurden die Säulen nacheinander jeweils einmal mit 2ml Wasser und 5ml 60mM Ammoniumformat/5mM Na- Tetraborat gewaschen. Die Elution der Inositolphosphate wurde danach mit 5x2ml 1M Ammoniumformat/0,1M Ameisensäure durchgeführt. Die gesammelten Fraktionen wurden für die Vermessung mit einem Scintillationsmessgerät mit 9ml Scintillationslösung (Flo.Scint IV der Firma Packard) behandelt.

#### 3.1.10. PKC- Translokation

COS- 7- Zellen wurden je nach Protokoll stimuliert, zweimal mit 50mM HEPES- Puffer (pH7,5) gewaschen und in 50mM HEPES- Puffer (pH 7,5; PMSF 0,1mM; Pepstatin 1µg/ml und Leupeptin 2µg/ml) suspensiert, homogenisiert und zentrifugiert (100.000 x g für 20min bei 4°C). Es folgte die Proteinbestimmung nach Lowry. Die Proben wurden mit SDS- PP versetzt und anschließend auf ein 7,5%iges SDS Gel aufgetragen. Danach erfolgte der Westernblot auf eine PVDF- Membran. Die Membranen wurden über Nacht in einer 1%igen TM- Lsg. (in TBS) geblockt und anschließend mit den jeweiligen spezifischen PKC- Antikörpern nachgewiesen.

#### 3.1.11. Statistik

Alle statistischen Auswertungen und Signifikantstests erfolgten mit dem Student's *t* Test ( $P < 0,05$ ).

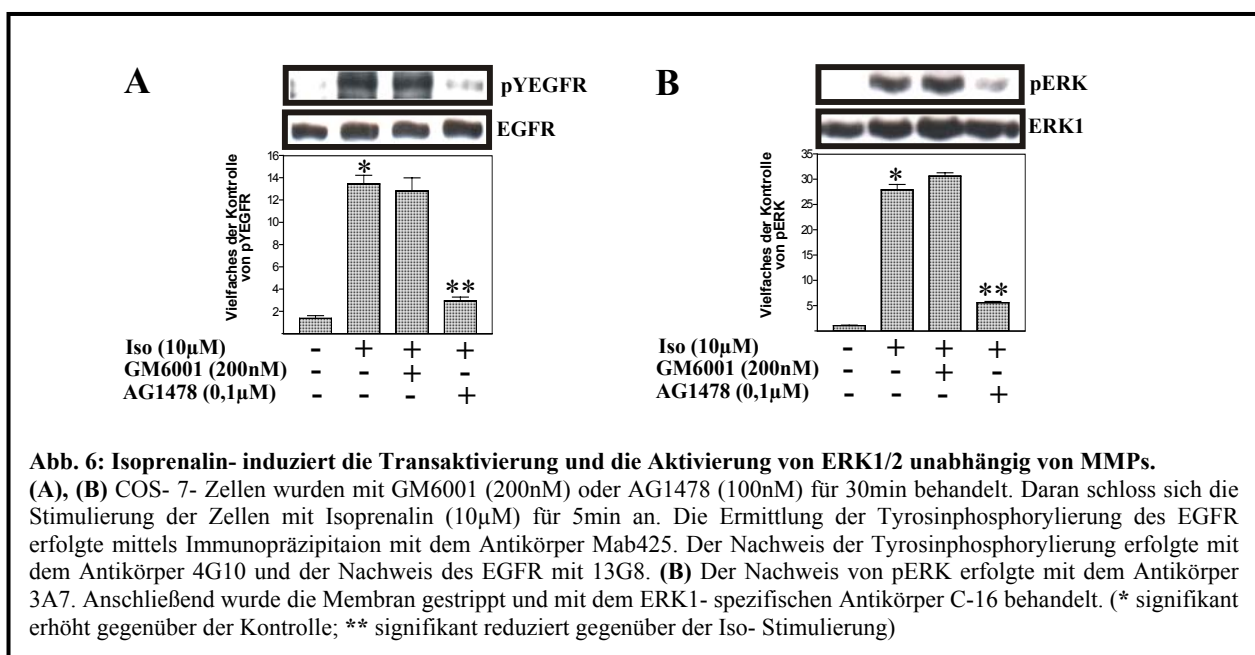
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Die Transaktivierung des EGFR

Vergleich des  $\beta_2$ - AR mit dem LPA- Rezeptor

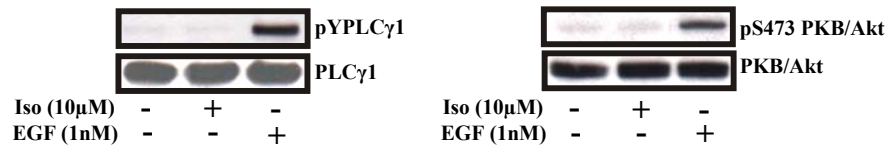
#### *4.1.1. Die MMP- unabhängige Transaktivierung des EGFR durch Isoprenalin*

Um den Einfluss der MMPs bei der Isoprenalin- induzierten Transaktivierung des EGFR und der Aktivierung von ERK1/2 zu untersuchen, wurden COS- 7- Zellen mit dem Breitspektrum- MMP- Inhibitor GM6001 behandelt und anschließend mit Isoprenalin stimuliert. Wie Abb. 6A und 6B zeigen, ist die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung des EGFR und die Aktivierung von ERK1/2 GM6001- insensitiv. Da MMPs offensichtlich keine Rolle spielen, sollte die Rolle der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR bei der Isoprenalin- induzierten ERK1/2- Aktivierung untersucht werden. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit dem EGFR- spezifischen Inhibitor AG1478 behandelt und anschließend mit Isoprenalin stimuliert. Abb. 6A und 6B bestätigen, dass AG1478 sowohl die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung des EGFR, als auch die Aktivierung von ERK1/2 blockiert (Maudsley et al., 2000).



Wenn Isoprenalin zur Aktivierung von ERK1/2 die Tyrosinkinase des EGFR benötigt, so müssten auch andere Signalwege, die von der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR abhängig sind, durch die Stimulierung mit Isoprenalin induziert werden können. Zu diesen Signalwegen gehören u.a. die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 sowie die Phosphorylierung von S473 der PKB/Akt (Schlessinger 2000b). Um dies zu überprüfen, wurden COS- 7- Zellen mit Isoprenalin und im Vergleich dazu mit EGF stimuliert. Wie jedoch in Abb. 7 deutlich wird, kann durch die Stimulierung mit Isoprenalin im Gegensatz zu EGF keine Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und auch keine Phosphorylierung von S473 der PKB/Akt induziert werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Isoprenalin zwar eine EGFR- abhängige Aktivierung von ERK1/2 induziert, der aktivierte EGFR jedoch nicht für die Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 und der PKB/Akt genutzt werden kann. Auch längere Stimulierungszeiten mit Isoprenalin führten zu keiner Zunahme der Phosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und der PKB/Akt (Ergebnis nicht gezeigt).



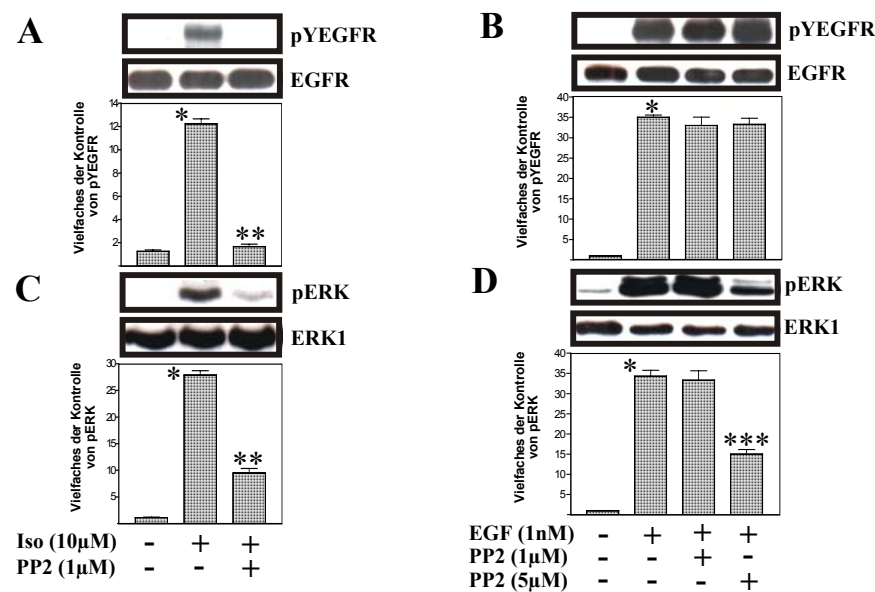
**Abb. 7: Isoprenalin vermittelt weder die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 noch die Phosphorylierung der PKB/Akt.**

Die Untersuchung der Phosphorylierung der PKB/Akt erfolgte durch direkten Westernblot mit dem Antikörper anti- pS473 PKB/Akt. Nach dem Strippen wurde die PKB/Akt mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen. Der Nachweis für die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 erfolgte mittels Immunopräzipitation mit einem PLC $\gamma$ 1- spezifischen Antikörper. Nach SDS- PAGE (10%) und Westernblot erfolgte der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung mit dem Antikörper 4G10. Nach dem Strippen erfolgte der Nachweis der PLC $\gamma$ 1 mit einem PLC $\gamma$ 1- spezifischen Antikörper. Diese Bilder stehen für vier voneinander unabhängige Experimente.

#### 4.1.2. c-Src vermittelt die Isoprenalin-induzierte Transaktivierung des EGFR und die Aktivierung von ERK1/2

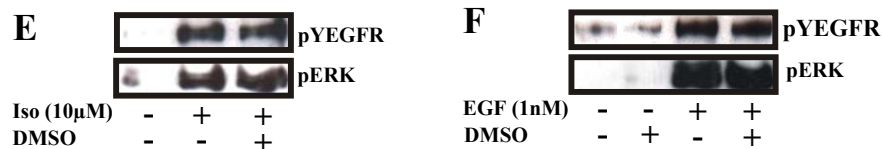
Im vorangegangenen Abschnitt konnte die Beteiligung von MMPs bei der Isoprenalin- induzierten Transaktivierung des EGFR und bei der Aktivierung von ERK1/2 ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund sollte als nächstes der Signalweg untersucht werden, auf dem die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung des EGFR und die Aktivierung von ERK1/2 vermittelt wird.

Die Beteiligung von c- Src bei der Isoprenalin- induzierten Transaktivierung des EGFR und der Aktivierung von ERK1/2 konnte durch die Verwendung von PP2, einem Src- Kinase spezifischen Inhibitor, bestätigt werden (Abb. 8A) (Daaka et al., 1997; Maudsley et al., 2000). Um Lösungsmittelleffekte ausschließen zu können, wurde der Einfluss von DMSO auf beide Signalwege untersucht. Wie Abb. 8E zeigt, hat DMSO in dem PP2 gelöst ist, keinen Einfluss auf diese Signalwege. Da bekannt ist, dass die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR nicht PP2- sensitiv ist und die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 hingegen nur durch sehr hohe PP2- Konzentrationen gehemmt werden kann (Daub et al., 1997), wurden diese Signalwege als zusätzliche Kontrollen für die Wirkung dieses Inhibitors mit aufgeführt. Wie Abb. 8B zeigt, ist die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR nicht PP2- sensitiv. Auch eine PP2- Konzentration von 10 $\mu$ M hatte keine Hemmung der EGF- induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGFR zur Folge (Kapitel 4.4.1; Abb. 37). Die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 konnte hingegen mit einer PP2- Konzentration von 5 $\mu$ M signifikant (Abb. 8D) und mit einer Konzentration von 10 $\mu$ M (Kapitel 4.4.1; Abb. 37) vollständig gehemmt werden. Dies bedeutet, dass niedrige PP2- Konzentrationen nicht ausreichend sind, um das starke EGF- Signal zu unterdrücken. Da DMSO keinen Einfluss auf die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 zeigte, kann die Hemmung von ERK1/2 auf den Inhibitor und nicht auf das Lösungsmittel zurückgeführt werden (Abb. 8F).



**Abb. 8: Isoprenalin induziert eine PP2- sensitive Transaktivierung des EGFR.**

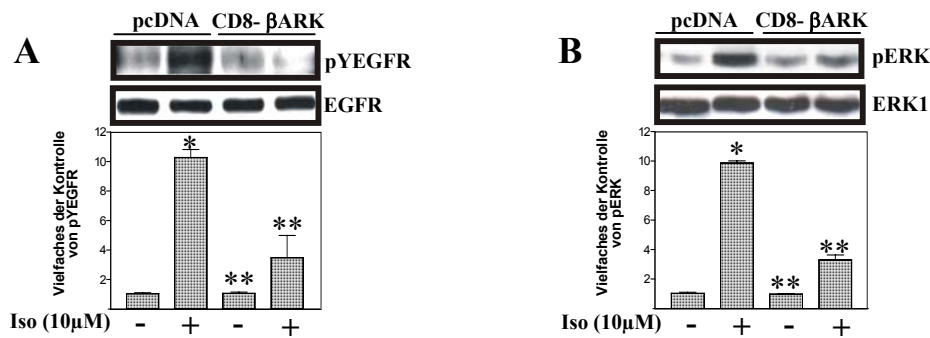
(A), (B), (C), (D) COS- 7- Zellen wurden 30min mit PP2 (1μM) (A), (B), (C), (D) behandelt und mit Isoprenalin (10μM) (A), (C) oder EGF (1nM) (B), (D) stimuliert (5min). (A), (B) Danach erfolgte die Immunopräzipitation des EGFR mit dem Antikörper Mab425 mit anschließender SDS- PAGE und Westernblot. (A), (B) Die Tyrosinphosphorylierung wurde mit 4G10 und der EGFR mit dem Antikörper 13G8 nachgewiesen. (C), (D) Der Nachweis von pERK wurde ohne vorherige Immunopräzipitation im direktem Westernblot durchgeführt. Der zum Nachweis von pERK verwendete Antikörper war 3A7. ERK1 wurde mit dem Antikörper C- 16 nachgewiesen.



(E), (F) Durchführung: siehe Abb. 8. (A), (B), (C), (D) (\* signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle; \*\* signifikant reduziert gegenüber der Iso- Stimulierung; \*\*\* signifikant reduziert gegenüber der EGF- Stimulierung)

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Isoprenalin- induzierte Aktivierung der Src- Kinasen im Unterschied zu LPA (Daub et al., 1997; Laffargue et al., 1999) und EGF upstream des EGFR erfolgt. Aus einigen Arbeiten war bekannt, dass  $\beta\gamma$ - Untereinheiten bei der Isoprenalin- induzierten Transaktivierung des EGFR und der nachfolgenden Aktivierung von ERK1/2 eine wichtige Rolle spielen. Dabei wird vermutet, dass die  $\beta\gamma$ - Untereinheiten über die Aktivierung von c- Src die Transaktivierung des EGFR vermitteln (Crespo et al., 1995; Schmitt et al., 2002b). Daher sollte als nächstes der Einfluss von  $\beta\gamma$ - Untereinheiten bei der Isoprenalin- induzierten Transaktivierung und der Aktivierung von ERK1/2 in COS- 7- Zellen untersucht werden.

Dazu wurden der  $\beta\gamma$ - Scavenger CD8-  $\beta$ ARK transfiziert und die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung des EGFR sowie die Aktivierung von ERK1/2 untersucht. Wie Abb. 9A und 9B zeigt, wurde durch die Überexpression von CD8-  $\beta$ ARK sowohl die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung als auch die Aktivierung von ERK1/2 unterdrückt. Damit kann die Rolle von  $\beta\gamma$ - Untereinheiten bei der Isoprenalin- induzierten Transaktivierung und der Aktivierung von ERK1/2 bestätigt werden.



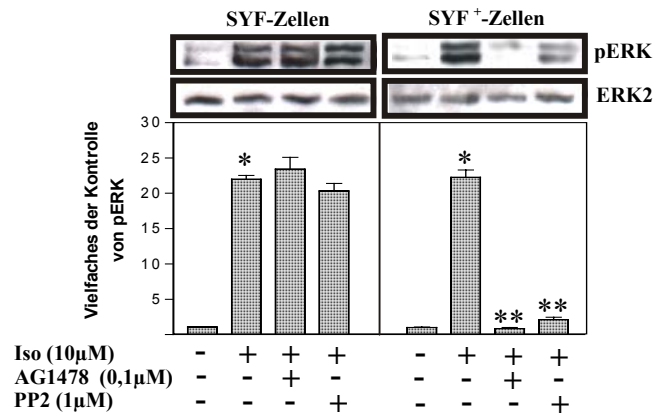
**Abb. 9: Die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung des EGFR und die Aktivierung von ERK1/2 sind von  $\beta\gamma$ - Untereinheiten abhängig.**

(A), (B) COS- 7- Zellen wurden mit pcDNA3 oder CD8-  $\beta$ ARK (C) nach der DEAE- Dextran Methode transfiziert. Danach wurden die Zellen mit Isoprenalin (10 $\mu$ M) 5min stimuliert. Es erfolgte die Immunopräzipitation des EGFR mit dem Antikörper Mab425. Der Nachweis von pERK wurde ohne vorherige Immunopräzipitation durchgeführt. Der Nachweis der Proteine und deren Phosphorylierungen wurde analog zu **Abb. 8** durchgeführt.

(\* signifikant erhöht zur Kontrolle; \*\* signifikant reduziert zur Iso- Stimulierung)

Eine weitere Bestätigung für die Beteiligung von c- Src und des EGFR bei der Isoprenalin- induzierten Aktivierung von ERK1/2 wurde durch die Verwendung von SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen erhalten. Der Unterschied zwischen beiden Zelllinien besteht darin, dass SYF<sup>+</sup>- Zellen nur c- Src aber nicht Fyn und Yes, SYF- Zellen dagegen weder c- Src und Fyn noch Yes exprimieren. Durch den Vergleich beider Zelllinien kann somit der Einfluss von c- Src auf bestimmte Signaltransduktionsprozesse genauer untersucht werden. Um die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 in SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen näher zu charakterisieren, wurden die Zellen mit AG1478 und PP2 behandelt und anschließend mit Isoprenalin stimuliert. Wie in Abb. 10 zu sehen ist, hatte keiner der verwendeten Inhibitoren in SYF- Zellen einen Einfluss auf die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2. Wurden hingegen SYF<sup>+</sup>- Zellen mit diesen Inhibitoren behandelt, so zeigte sich eine vollständige Blockierung der Isoprenalin- induzierten Aktivierung von ERK1/2. Mit diesen Ergebnissen kann die Beteiligung von c- Src und des EGFR bei der Isoprenalin- induzierten Aktivierung von ERK1/2 bestätigt werden. Eine Voraussetzung für die Aktivierung von ERK1/2 über den EGFR scheint dabei die Expression von c- Src zu sein. Wird c- Src, wie in SYF- Zellen, nicht exprimiert, so sind alle Inhibitoren wirkungslos, die Proteine hemmen, die an der c- Src- abhängigen Aktivierung von ERK1/2 beteiligt sind. Durch die fehlende Expression von c- Src kann der EGFR nicht mehr transaktiviert werden. Dies hat zur Folge, dass ein Alternativweg zur Aktivierung von ERK1/2 eingeschaltet wird. Dieser Signalweg verläuft unabhängig von c- Src und dem EGFR. Solch ein alternativer Signalweg könnte die cAMP/PKA- abhängige und Ras- unabhängige Aktivierung von ERK1/2 sein (Schmitt et al., 2000; Huang et al., 2004) (nähere Erläuterungen: siehe **Diskussion**).

Da PP2 nur in SYF<sup>+</sup>- Zellen, aber nicht in SYF- Zellen wirksam ist, kann darüber hinaus angenommen werden, dass PP2 im Falle der Isoprenalin- induzierten Aktivierung von ERK1/2 nur c- Src spezifisch hemmt.



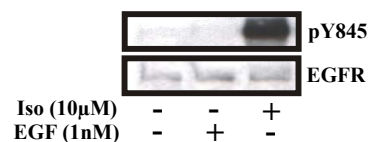
**Abb. 10: c- Src ist essentiell für die Isoprenalin- induzierte und EGFR- abhängige Aktivierung von ERK1/2.**

SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen wurden 30min mit AG1478 (0,1μM) und PP2 (1μM) behandelt und anschließend 5min mit Isoprenalin stimuliert. Anschließend erfolgt eine SDS- PAGE (10%) und der Westernblot. Der Nachweis von pERK erfolgte mit dem Antikörper 3A7. Der Nachweis von ERK1/2 erfolgte in einer separaten SDS- PAGE mit anschließendem Westernblot. Der verwendete Antikörper war der ERK1- spezifische Antikörper C- 16. Diese Bilder stehen für zwei voneinander unabhängige Experimente. (\* signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle; \*\* signifikant reduziert gegenüber der Iso- Stimulation)

Wie anhand der Ergebnisse nach Anwendung von PP2 (Abb. 8A) und Überexpression von CD8- βARK (Abb. 9) vermutet werden kann, wird die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung und die Aktivierung von ERK1/2 in COS- 7- Zellen durch eine Src- Kinase vermittelt. Dabei ist c- Src sowohl in COS- 7- (Maudsley et al., 2000), als auch in SYF- Zellen (Abb. 10) entscheidend.

Am EGFR existieren neben den Autophosphorylierungsstellen auch c- Src- spezifische Phosphorylierungsstellen. Dazu gehört u.a. der Tyrosinrest EGFR- Y845 (Tice et al., 1999). Da c- Src entscheidend für die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR ist, müsste durch die Stimulierung der Zellen mit Isoprenalin eine Phosphorylierung von EGFR- Y845 nachweisbar sein.

Um diese Fragestellung zu klären, wurden die Zellen mit Isoprenalin und EGF als Positivkontrolle stimuliert. Trotz aller Vermutungen konnte jedoch keine Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 nachgewiesen werden (Abb. 11). Auch die Überexpression von c- Src hatte keine Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 zur Folge (Ergebnis nicht gezeigt).

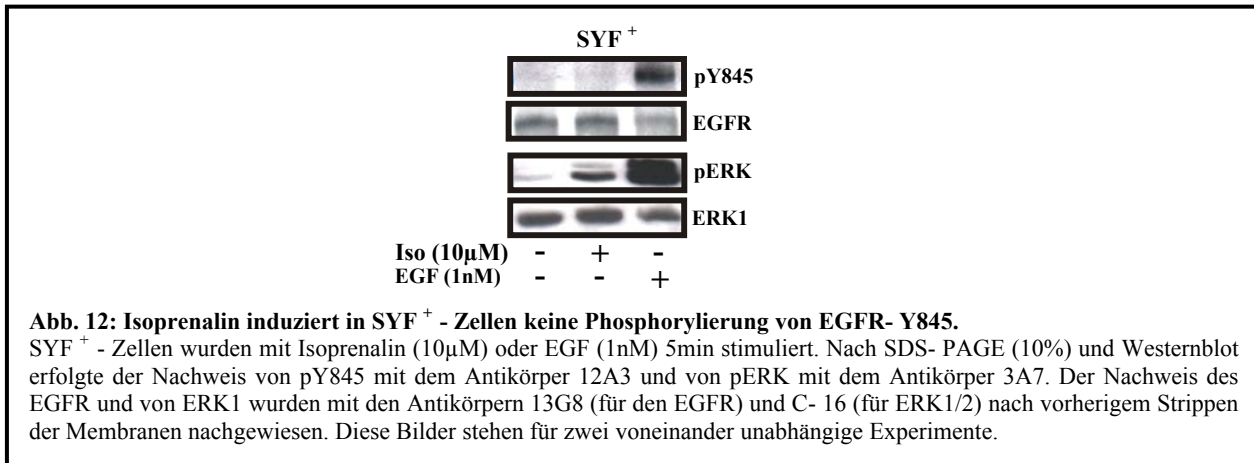


**Abb. 11: Isoprenalin induziert in COS- 7- Zellen keine Phosphorylierung von EGFR- Y845.**

COS- 7- Zellen wurden mit Isoprenalin (10μM) 5min stimuliert. Danach erfolgte der Nachweis von pY845 mittels direktem Westernblot mit dem Antikörper 12A3. Der EGFR wurde nach vorherigem Strippen der Membran mit dem Antikörper 13G8 nachgewiesen. Dieses Bild steht für vier voneinander unabhängige Experimente.

Um eine Bestätigung für dieses Ergebnis zu erhalten, wurde untersucht, ob Isoprenalin in SYF<sup>+</sup>- Zellen diese Phosphorylierung induzieren kann. Der Vorteil von SYF<sup>+</sup>- Zellen ist, dass diese Zelllinie nur c- Src exprimiert. SYF<sup>+</sup>- Zellen wurden daher mit Isoprenalin und EGF als Positivkontrolle

stimuliert. Dabei konnte festgestellt werden, dass Isoprenalin im Gegensatz zu EGF auch in SYF<sup>+</sup>-Zellen keine Phosphorylierung von EGFR- Y845 induzieren kann (Abb. 12). Da Isoprenalin ERK1/2 aktiviert, kann die fehlende Phosphorylierung von EGFR- Y845 nicht auf eine fehlende Wirksamkeit von Isoprenalin zurückgeführt werden (Abb. 12).



Aus diesem Ergebnis kann geschlussfolgert werden, dass c- Src zwar eine Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung (Transaktivierung des EGFR) (Abb. 8A), jedoch keine Phosphorylierung von EGFR- Y845 vermitteln kann (Abb. 11).

#### 4.1.3. LPA induziert über die Aktivierung von MMPs eine Vielzahl von Signalwegen downstream des EGFR

Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung des EGFR nicht über die Aktivierung von MMPs, sondern über einen intrazellulären c- Src- abhängigen Signalweg vermittelt wird. Im Unterschied dazu vermittelt der LPA- Rezeptor in COS- 7- Zellen die Transaktivierung des EGFR über die Freisetzung von HB- EGF (Prenzel et al., 1997; Yan et al., 2002). Da die LPA- induzierte Transaktivierung des EGFR in COS- 7- Zellen ein gut untersuchter Mechanismus ist, wurde auf dessen experimentelle Darstellung verzichtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hemmung der LPA- induzierten Freisetzung von HB- EGF zur vollständigen Blockierung der Transaktivierung des EGFR sowie der Aktivierung von ERK1/2 führt (Prenzel et al., 1997, Yan et al., 2002). Des weiteren ergibt sich aus einer Reihe von Arbeiten, dass durch LPA die Aktivierung vieler Signalproteine, wie z.B. von Src- und PI3- Kinasen, eher downstream des transaktivierten EGFR induziert und so anschließend die Aktivierung von ERK1/2 und der PKB/Akt ermöglicht wird (Daub et al., 1997; Laffargue et al., 1999; Yart et al., 2002).

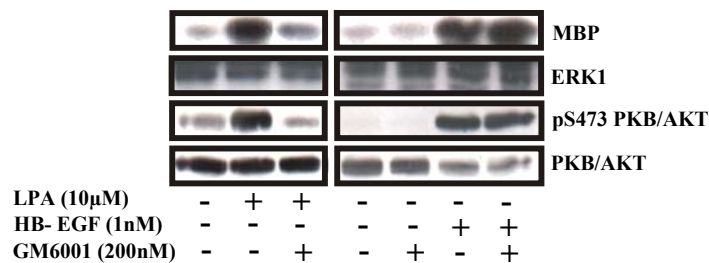
Im Folgenden sollte geklärt werden, welche Signalwege in COS- 7- Zellen noch durch LPA aktiviert werden können, und ob deren Einschaltung von der Aktivität der MMPs abhängig ist. Insbesondere sollte untersucht werden, ob durch LPA eine MMP- abhängige Aktivierung der PLCγ1, der PKB/Akt und die Phosphorylierung von EGFR- Y845 induziert wird.



Um zunächst die Wirkung von GM6001 zu prüfen, wurde die LPA- induzierte Aktivierung von ERK1/2 untersucht. Dabei konnte bestätigt werden, dass LPA die Aktivierung von ERK1/2 MMP- abhängig induziert (Abb. 13) (Prenzel et al., 1997).

Weiterhin kann LPA in COS- 7- Zellen eine EGFR- abhängige Aktivierung der PKB/Akt induzieren (Yart et al., 2002). Welche Rolle EGFR- Liganden dabei spielen, wurde jedoch noch nicht näher untersucht. Wie allerdings durch die Verwendung von GM6001 deutlich wurde, spielen MMPs auch bei diesem Signalweg eine entscheidende Rolle (Abb. 13).

Im Vergleich dazu ist sowohl die HB- EGF- induzierte Aktivierung der PKB/Akt als auch die Aktivierung von ERK1/2 GM6001- insensitiv, was darauf hindeutet, dass GM6001 nur bei einer Beteiligung von MMPs eine Hemmwirkung zeigt (Abb. 13).



**Abb. 13: Die LPA- induzierte Aktivierung der PKB/Akt und von ERK1/2 ist MMP- abhängig.**

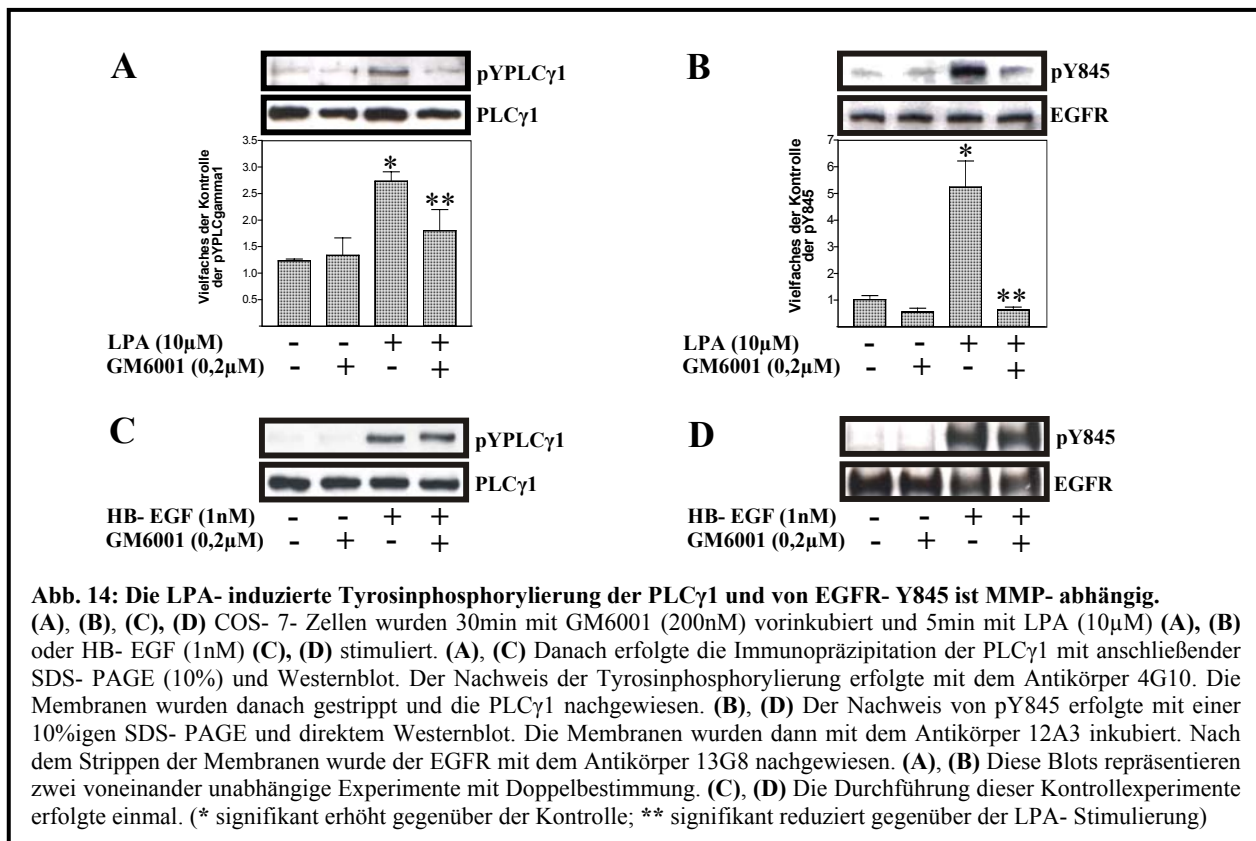
COS- 7- Zellen wurden 30min mit GM6001 (200nM) behandelt und anschließend 5min mit LPA (10μM) oder HB- EGF (1nM) stimuliert. Die Phosphorylierung der PKB/Akt wurde mit dem Antikörper anti- pS473 PKB/Akt und der Nachweis der PKB/Akt mit einem spezifischen Antikörper durchgeführt. Die Untersuchung der Aktivierung von ERK1/2 erfolgte durch den MAPK- Assay. Diese Blots sind repräsentativ für zwei Experimente.

Die vollständige Hemmung der Aktivierung von ERK1/2 und der PKB/Akt durch GM6001 bestätigt, dass die Aktivierung der MMPs essentiell für die LPA- vermittelte Transaktivierung ist (Yan et al., 2002).

Als nächstes sollte untersucht werden, welche zusätzlichen Signalwege durch LPA über die Aktivierung von MMPs vermittelt werden können. Dazu wurden COS- 7- Zellen mit LPA stimuliert und die Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 und die Phosphorylierung von EGFR- Y845 untersucht. Um gleichzeitig die Rolle von MMPs bei der Aktivierung dieser Signalwege zu klären, erfolgte vor der Stimulierung die Behandlung der Zellen mit GM6001.

Es konnte festgestellt werden, dass LPA die Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 und die Phosphorylierung von EGFR- Y845 induzieren kann (Abb. 14A und 14B). Darüber hinaus wird durch die Verwendung von GM6001 deutlich, dass auch diese LPA- induzierten Signalwege MMP- abhängig vermittelt werden (Abb. 14A und 14B).

Als Negativkontrolle für die Wirkung von GM6001 wurde HB- EGF verwendet und festgestellt, dass weder die HB- EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 noch die Phosphorylierung von EGFR- Y845 GM6001- sensitiv waren (Abb. 14C und 14D).



#### 4.1.4. HB- EGF- vermittelte Aktivierung der PLCγ1 und von ERK1/2

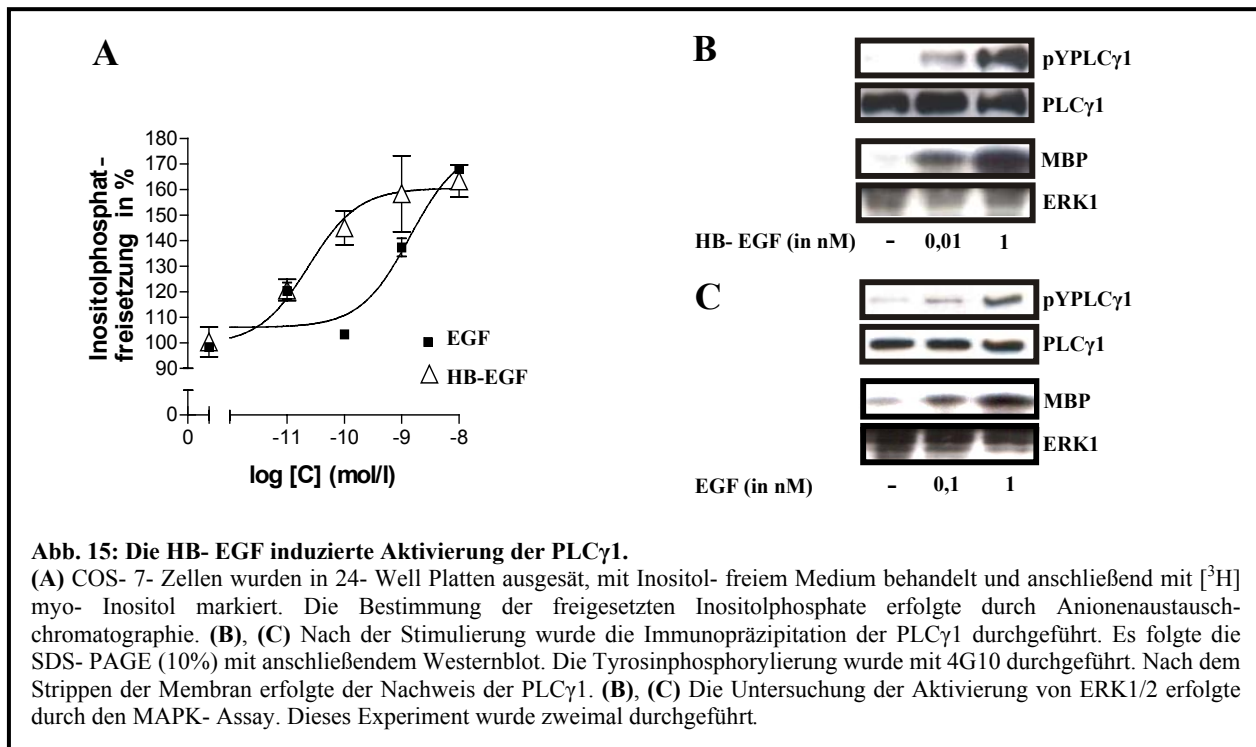
Als nächstes sollte die Aktivierung der PLCγ1 durch HB- EGF im Vergleich zu EGF untersucht werden. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass die HB- EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1, die Inositolphosphatfreisetzung und auch die Aktivierung von ERK1/2 ab einer Konzentration von 10pM nachweisbar sind (Abb. 15A und 15B). Im Vergleich dazu konnte durch EGF erst ab einer Konzentration von 0,1nM eine nachweisbare Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1, eine Aktivierung von ERK1/2 und eine Inositolphosphatfreisetzung induziert werden (Abb. 15A und 15C).

Daraus kann geschlossen werden, dass HB- EGF bei der Induzierung der Aktivierung der PLCγ1 10-fach effektiver als EGF ist. Dies deutet daraufhin, dass sehr niedrige Konzentrationen an HB- EGF ausreichend sind, um über den EGFR bestimmte Signalwege zu aktivieren.

Somit kann vermutet werden, dass auch die GPCR- vermittelte Transaktivierung und die Aktivierung EGFR- abhängiger Signalwege über die Freisetzung von sehr geringen HB- EGF- Konzentrationen erfolgen kann.

Würde Isoprenalin die Freisetzung von HB- EGF induzieren, so müsste durch die hohe Effektivität dieses EGFR- Liganden eine GM6001- sensitive Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 nachweisbar sein.

Somit kann auf indirektem Wege die Beteiligung von HB- EGF bei der Isoprenalin- induzierten Transaktivierung des EGFR ausgeschlossen werden.



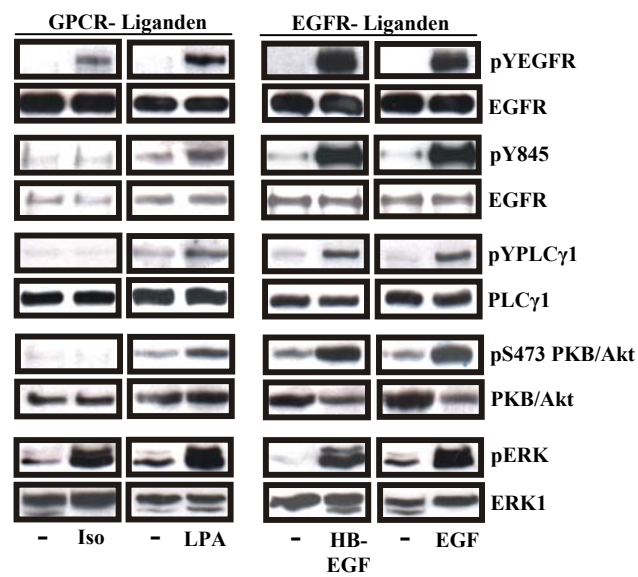
#### 4.1.5. Übersicht der Isoprenalin-, LPA-, EGF- und HB-EGF- induzierten Signalwege

In diesem Abschnitt soll ein Überblick über die Isoprenalin-, LPA-, EGF- und HB-EGF- induzierten Signalwege gegeben werden. Daraus wird ersichtlich, dass die einzigen Gemeinsamkeiten zwischen Isoprenalin und LPA in der Vermittlung der Transaktivierung des EGFR und der nachfolgenden Aktivierung von ERK1/2 bestehen.

Im Unterschied zu Isoprenalin vermittelt LPA die Transaktivierung jedoch über die Freisetzung von EGFR- Liganden (Prenzel et al., 1999). Dies könnte die Voraussetzung dafür sein, dass LPA neben der Aktivierung von ERK1/2, zusätzlich die Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1, die Phosphorylierung von EGFR- Y845 sowie die Aktivierung der PKB/Akt induzieren kann.

Daher könnte vermutet werden, dass die Art und Weise, auf der die Aktivierung/Transaktivierung des EGFR erfolgt, für das Anschalten bestimmter Signalwege entscheidend ist. Diese Ergebnisse lassen weiterhin die Schlussfolgerung zu, dass durch verschiedene GPCRs unterschiedliche Transaktivierungs- und Autophosphorylierungsmuster des EGFR vermittelt werden, die nur zur Aktivierung bestimmter Signalwege genutzt werden können. LPA scheint dabei über die Freisetzung von HB-EGF, genau wie EGF, eine vollständige Aktivierung des EGFR zu induzieren, was möglicherweise dazu führt, dass die komplette Signaltransduktion downstream des EGFR aktiviert werden kann (Abb. 16).

GPCR- Liganden, wie Isoprenalin, die keine Freisetzung von EGFR- Liganden induzieren, vermitteln hingegen nur eine partielle Aktivierung des EGFR. So können nur ganz bestimmte Signalwege aktiviert werden. Daher kann vermutet werden, dass LPA über die Freisetzung von HB-EGF eine wesentlich effektivere Transaktivierung des EGFR vermittelt als Isoprenalin.



**Abb. 16: Vergleich der GPCR- Ligand- vermittelten und EGFR- Ligand- vermittelten Signalwege.**

COS- 7- Zellen wurden 5min mit Isoprenalin (10μM), LPA (10μM), EGF (1nM) oder HB- EGF (1nM) stimuliert. Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLCγ1 erfolgte durch Immunopräzipitation mit dem Antikörper 4G10. Der Nachweis von pY845, pS473 PKB/Akt und pERK erfolgte ohne vorherige Immunopräzipitation im direkten Westernblot mit den spezifischen Antikörpern. Diese Bilder stehen für zwei voneinander unabhängige Experimente.

## 4.2. Der Einfluss des Aktivierungszustandes des EGFR auf mitogene Signalwege des $\beta_2$ -AR

Im vorangegangenen Kapitel wurde die Vermutung aufgestellt, dass GPCRs den EGFR in Abhängigkeit von der Freisetzung von EGFR- Liganden partiell oder vollständig aktivieren/transaktivieren können. Der  $\beta_2$ -AR scheint dabei möglicherweise, im Unterschied zum LPA-Rezeptor, nur eine partielle Aktivierung/Transaktivierung des EGFR zu vermitteln. Aus diesem Grund sollte nun untersucht werden, ob durch die Vorinkubation mit EGF oder durch die Überexpression des EGFR Voraussetzungen geschaffen werden können, die Isoprenalin dazu befähigen, in COS- 7- Zellen neben ERK1/2 zusätzliche Signalwege zu aktivieren.

Dadurch sollte die Freisetzung von EGFR- Liganden simuliert und somit ein vollständig aktivierter oder auch präaktiverter EGFR induziert werden. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei auf der Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 und der Phosphorylierung von EGFR- Y845.

Da zu erwarten war, dass durch die Vorinkubation mit EGF selbst verschiedene Signalwege aktiviert werden, wurden zunächst die EGF- induzierten Signalwege näher charakterisiert. So sollte untersucht werden, durch welche EGF- Konzentrationen und Stimulierungszeiten eine ausreichende und nicht zu stark ausgeprägte Aktivierung des EGFR erreicht werden kann.

Des weiteren sollte in zusätzlichen Vorexperimenten geklärt werden, welche Auswirkungen die Überexpression des EGFR und die dadurch erhöhte Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors in COS- 7- Zellen hat.

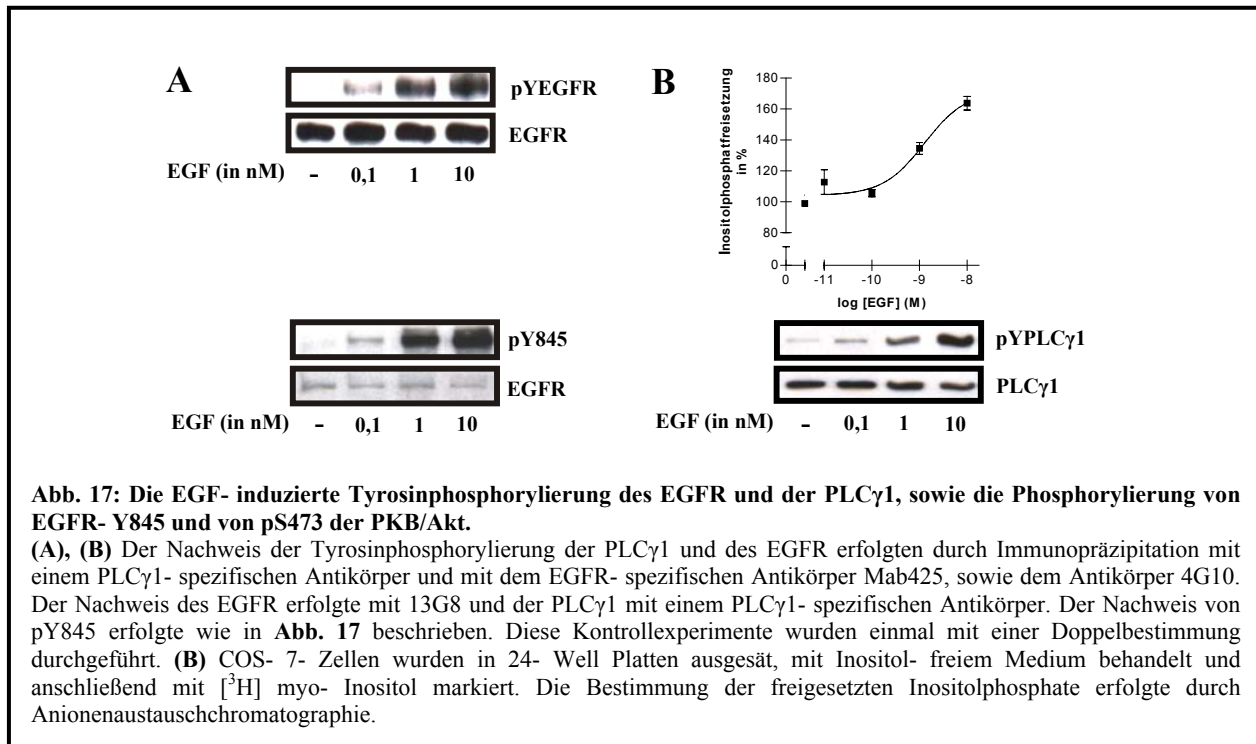
Dabei wurde in beiden Systemen insbesondere die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 untersucht, da die PLC $\gamma$ 1 ein direktes Substrat des EGFR ist. Dadurch können Rückschlüsse auf den Aktivierungszustand des EGFR gewonnen werden.

### 4.2.1 Der konzentrations- und zeitabhängige Verlauf der EGF-induzierten Aktivierung der PLC $\gamma$ 1

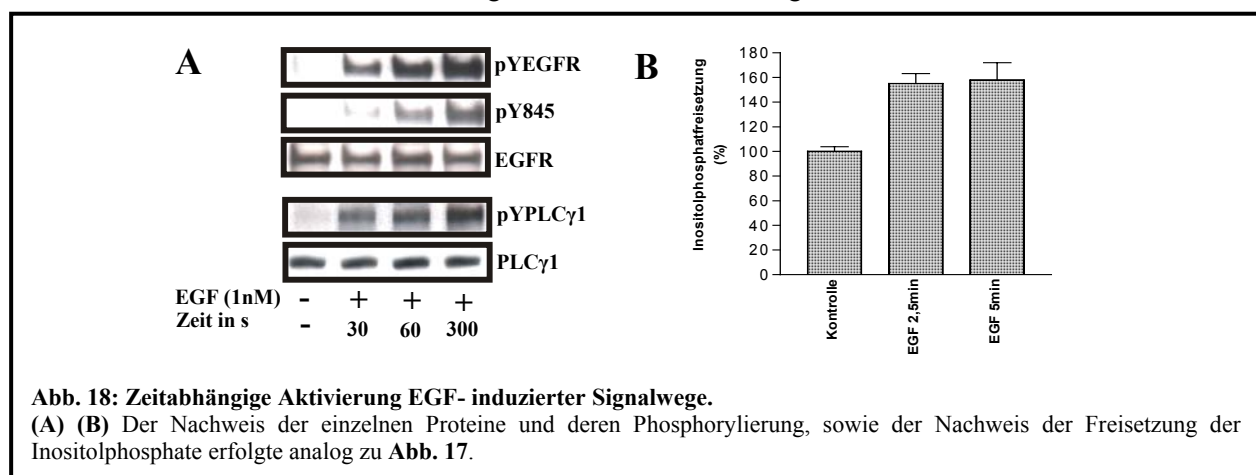
Um die ideale EGF- Konzentration für die nachfolgenden Kostimulierungsexperimente zu erhalten, wurden COS- 7- Zellen mit verschiedenen EGF- Konzentrationen stimuliert und die Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLC $\gamma$ 1, sowie die Phosphorylierung von EGFR- Y845 untersucht. Wie Abb. 17A und 17B zeigen, werden diese Signalwege ab einer EGF- Konzentration von 0,1nM nachweisbar. Des weiteren korreliert die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 mit der Inositolphosphatfreisetzung. Dies bestätigt indirekt, dass die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 eine Voraussetzung für deren Aktivierung ist (Chattopadhyay et al., 1999). Dies Ergebnisse lassen vermuten, dass bereits mit einer EGF- Konzentration von 0,1nM ein vollständig aktivierter EGFR induziert werden kann.

Für die nachfolgenden Kostimulierungsexperimente wurden daher die EGF- Konzentrationen 0,1nM und 1nM gewählt, da zu hohe EGF- Konzentrationen zu starke Phosphorylierungssignale als Nachteil

haben würden. Dies wäre deshalb unvorteilhaft, da zusätzliche Isoprenalin- induzierte Signale überdeckt werden könnten.



Als nächstes sollte die Mindeststimulierungszeit bestimmt werden, ab der die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLCγ1, sowie die Phosphorylierung von EGFR- Y845 in COS- 7- Zellen nachweisbar werden. Daher wurden COS- 7- Zellen unterschiedlich lang mit EGF (1nM) stimuliert. Es konnte festgestellt werden, dass die Zellen mindestens 30s mit EGF stimuliert werden müssen, bevor die Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLCγ1, sowie die Phosphorylierung von EGFR- Y845 nachweisbar werden (Abb. 18A). Für die Bestimmung der Inositolphosphatfreisetzung war aufgrund des experimentellen Aufbaus eine Stimulationszeit von 30s nicht bestimmbar. Wie aber in Abb. 18B deutlich wird, scheint die Inositolphosphatfreisetzung, wie die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1, sehr schnell zu erfolgen, da nach 2,5min bereits das Maximum erreicht wird. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass schon nach einer Stimulationszeit von 30s ein vollständig aktivierter EGFR vorliegt.

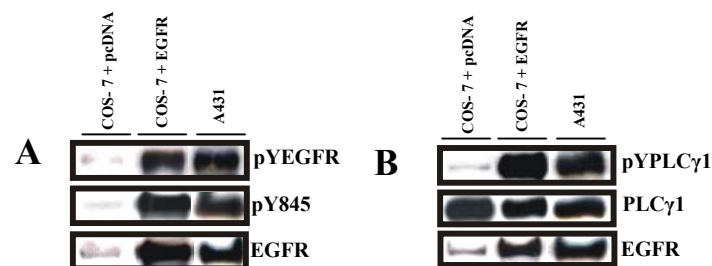


Um die Präaktivierung des EGFR bei den nachfolgenden Kostimulierungsexperimenten zu induzieren, wurden die Zellen daher mindestens 30s mit EGF vorstimuliert, bevor die zusätzliche Stimulierung mit Isoprenalin erfolgte.

#### 4.2.2. Die Überexpression des EGFR führt zu einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1

Eine weitere Möglichkeit, die basale Aktivität des EGFR und damit dessen Präaktivierung zu erreichen, besteht in der Überexpression des Rezeptors. Aus diesem Grund wurde der EGFR in COS- 7- Zellen überexprimiert. Im Vergleich dazu wurde die Zelllinie A431 verwendet, die den EGFR endogen bis zu 100-fach überexprimiert. Anschließend wurde die basale Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLC $\gamma$ 1 sowie die basale Phosphorylierung von EGFR- Y845 im Überexpressionssystem COS- 7 (COS- 7- Zellen mit transfiziertem EGFR) und in A431- Zellen untersucht. Dabei erfolgte der Vergleich mit COS- 7- Zellen, die nur mit pcDNA transfiziert wurden. Es konnte festgestellt werden, dass die Überexpression des EGFR eine starke Erhöhung der basalen Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLC $\gamma$ 1 sowie der Phosphorylierung von EGFR- Y845 zur Folge hatte (Abb. 19).

Die Zunahme der basalen Tyrosinphosphorylierung des EGFR, der PLC $\gamma$ 1 und von EGFR- Y845 können dabei auf die Überexpression des EGFR zurückgeführt werden. Dies wird daraus ersichtlich, dass die Zunahme dieser Phosphorylierungen exakt mit der Zunahme der EGFR- Moleküle korreliert (siehe Reblot EGFR; Abb. 19).



**Abb. 19: Die Überexpression des EGFR bewirkt die Zunahme der basalen Phosphorylierung des EGFR, von EGFR-Y845 und der PLC $\gamma$ 1.**

(A), (B) COS- 7- Zellen wurden mit pcDNA3 oder dem EGFR- WT nach der DEAE- Dextran Methode transfiziert. A431- Zellen wurden nicht transfiziert. Der Nachweis der Phosphorylierung des EGFR (A) und von EGFR- Y845 (A) erfolgte mit direktem Westernblot. Dazu wurden die Antikörper 4G10 (für den pYEGFR) und 12A3 (für pY845) verwendet. Danach wurden die Membranen gestrippt und die jeweiligen Proteine nachgewiesen. Dazu wurde der Antikörper 13G8 für den EGFR verwendet. (B) Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 erfolgte analog zu Abb. 18. Diese Bilder stehen für zwei voneinander unabhängige Experimente.

Wie in diesen Bildern zu erkennen ist, sind die basalen Tyrosinphosphorylierungen der Proben mit überexprimiertem EGFR im Vergleich zu allen nachfolgenden Abbildungen sehr stark. Die Erklärung dafür hängt mit dem Aufbau der Experimente zusammen. Dabei wurden die SDS- Gele so beladen, dass die Proben mit überexprimiertem EGFR direkt mit den Proben verglichen werden konnten, die mit pcDNA transfiziert wurden. Da die Signale der Proben mit transfizierter pcDNA im Vergleich zu den Proben mit transfiziertem EGFR sehr schwach waren, erfolgte eine sehr lange Belichtungszeit der Röntgenfilme. Dadurch sind die Banden der basalen Tyrosinphosphorylierung in dieser Abbildung im Vergleich zu allen nachfolgenden Abbildungen sehr stark

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 von der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR abhängig ist. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob durch die erhöhte

Tyrosinkinaseaktivität des EGFR, die durch dessen Überexpression induziert wird, die Voraussetzungen geschaffen werden können, die zu einer Zunahme der basalen Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 führen. Wie in Abb. 19A und 19B gezeigt wird, steigt durch die Überexpression des EGFR nicht nur dessen basale Tyrosinphosphorylierung sondern auch die basale Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1. Dabei kann die stark erhöhte basale Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 in Zellen mit überexprimiertem EGFR nicht durch die Zunahme der Menge an PLC $\gamma$ 1-Molekülen erklärt werden. Dies wird daraus ersichtlich, dass die Anzahl der PLC $\gamma$ 1-Moleküle in Zellen mit überexprimiertem EGFR und in Zellen mit transfizierter pcDNA nahezu identisch ist (Abb. 19B). Daher kann vermutet werden, dass durch die Überexpression des EGFR die PLC $\gamma$ 1 konstitutiv an der Zellmembran vorkommt und dadurch phosphoryliert wird. Dies lässt vermuten, dass die Überexpression des EGFR ausreicht, um die Andockstellen für die PLC $\gamma$ 1 (pY1173 und pY992) zu schaffen. Somit kann geschlossen werden, dass durch die Überexpression des EGFR die Ausbildung funktioneller EGFR-Dimere induziert wird, die in der Lage sind, Signalwege, wie die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 zu vermitteln.

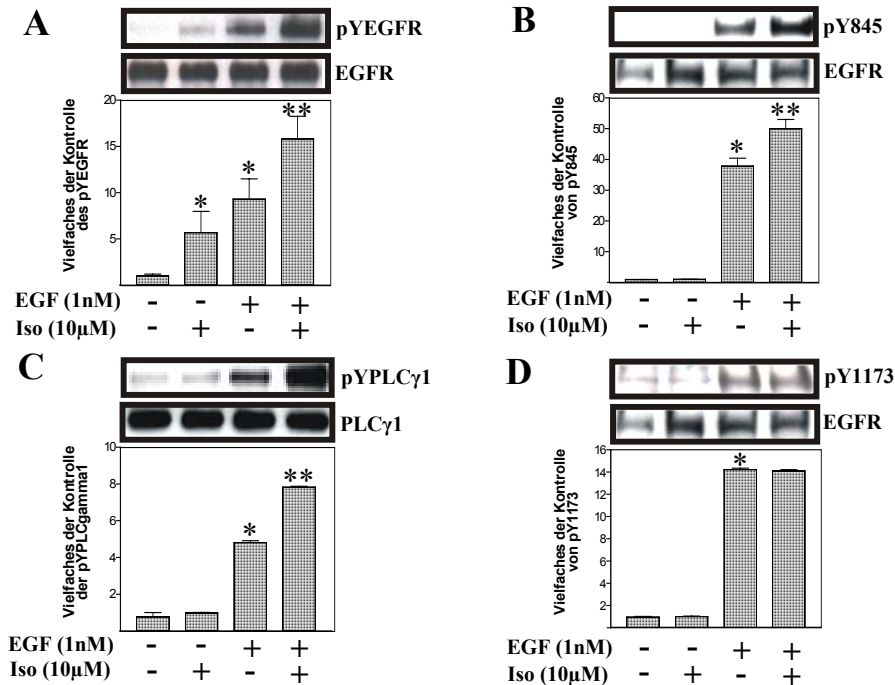
Diese Vorversuche lassen den Schluss zu, dass die Voraussetzungen für eine vollständige Aktivierung des EGFR durch die Stimulierung mit EGF (ohne überexprimierten EGFR) oder durch die Überexpression des EGFR geschaffen werden können. Die Präaktivierung des EGFR kann demnach auf beiden Wegen erfolgen. Aus diesem Grund eignen sich beide Systeme für die folgenden Experimente. Dabei sollte durch Stimulierung mit EGF oder durch Überexpression des EGFR der Einfluss eines präaktivierten EGFR auf Isoprenalin-induzierte Signalwege untersucht werden. Um einen endogenen Vergleich zu EGFR-überexprimierenden COS-7-Zellen zu erhalten, wurden A431-Zellen verwendet, die den EGFR endogen 100-fach überexprimieren.

#### 4.2.3. Die Kostimulation bewirkt in COS-7-Zellen eine Isoprenalin-induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1

Wie aus Abb. 16 ersichtlich wird, führt die Einzelstimulierung der Zellen mit Isoprenalin nur zur Tyrosinphosphorylierung des EGFR. Signalwege, wie die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und die Phosphorylierung von EGFR-Y845, konnten durch die Stimulierung mit Isoprenalin nicht nachgewiesen werden (Abb. 16; 20B; 20C). Als nächstes sollte untersucht werden, ob sich dieses, durch die Einzelstimulierung mit Isoprenalin induzierte und EGFR-abhängige Signaltransduktionsprofil verändert, wenn die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR durch die Vorinkubation mit EGF oder durch die Überexpression des EGFR erhöht wird. Zunächst wurde untersucht, welche Veränderungen auftreten, wenn COS-7-Zellen 30s mit EGF vorinkubiert und anschließend mit Isoprenalin kostimuliert wurden. Erfolgte die Stimulierung nach diesem Schema, so hatte dies eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung des EGFR (Abb. 20A), der PLC $\gamma$ 1 (Abb. 20C) und eine leichte Zunahme der Phosphorylierung von EGFR-Y845 (Abb. 20B) zur Folge. Die Phosphorylierung von EGFR-Y1173 blieb nach Kostimulation im Vergleich zur Einzelstimulierung mit EGF unverändert (Abb. 20D). Dies lässt die Vermutung zu, dass die Präaktivierung des EGFR durch EGF entscheidend



für die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 sowie für die Phosphorylierung von EGFR- Y845 ist. Isoprenalin scheint hingegen auch unter diesen Bedingungen nicht in der Lage zu sein, die Phosphorylierung von EGFR- Y1173 zu induzieren.



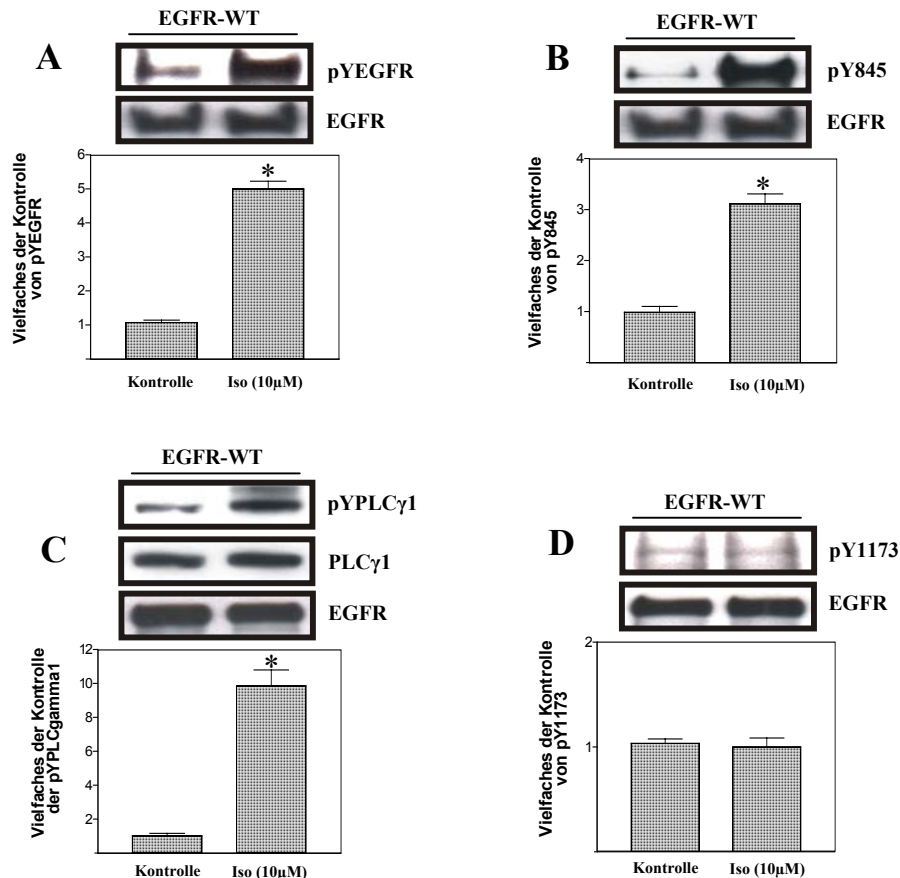
**Abb. 20:** Die Kostimulation von COS- 7- Zellen bewirkt eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLC $\gamma$ 1.

(A), (C) Die Zellen wurden mit EGF 30s vor- und anschließend mit Isoprenalin weitere 5min kostimuliert. Die Bestimmung der Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLC $\gamma$ 1 erfolgte durch Immunopräzipitation mit Mab425 (für den EGFR) und einem PLC $\gamma$ 1- spezifischen Antikörper. Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung wurde mit 4G10 durchgeführt. Der Nachweis des EGFR erfolgte mit 13G8 und der Nachweis der PLC $\gamma$ 1 mit einem spezifischen Antikörper. (B), (D) Der Nachweis von pY845 (B) und von pY1173 (D) erfolgte ohne Immunopräzipitation im direkten Westernblot mit dem jeweils spezifischen Antikörper. Nach dem Strippen wurden die Proteine mit dem jeweils spezifischen Antikörper nachgewiesen. Die Blots repräsentieren mindestens drei voneinander unabhängige Experimente. (B) und (D) haben den selben EGFR- Reblot, da die Ergebnisse aus einem Experiment stammen. (\* signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle; \*\* signifikant erhöht gegenüber der EGF- Stimulierung)

#### 4.2.4. Durch Überexpression des EGFR wird eine Isoprenalin-induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 bewirkt

Des weiteren sollte untersucht werden, ob auch durch die Überexpression des EGFR und die damit verbundene Erhöhung der basalen Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors das Signaltransduktionsprofil des Isoprenalins verändert werden kann. Dazu wurde der EGFR in COS- 7- Zellen überexprimiert und die Zellen mit Isoprenalin stimuliert.

Wie Abb. 21 zeigt, kommt es zu einer Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLC $\gamma$ 1 sowie zur Phosphorylierung von EGFR- Y845. Eine Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y1173 konnte auch unter diesen Bedingungen nicht nachgewiesen werden.

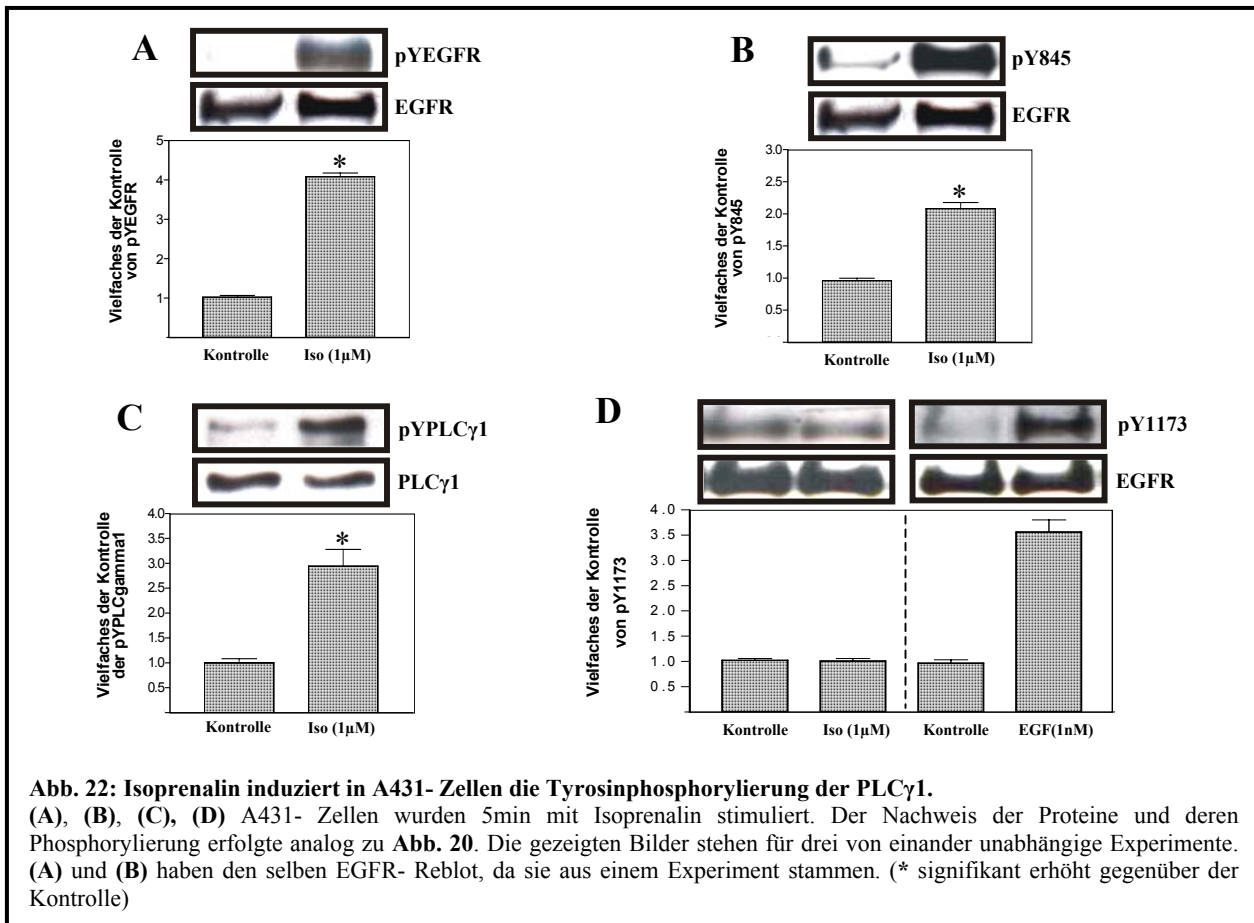


**Abb. 21: Die Überexpression des EGFR bewirkt eine Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung des EGFR, von EGFR- Y845 und der PLCγ1.**

(A), (B), (C), (D) COS- 7- Zellen wurden mit dem EGFR- WT mittels DEAE- Dextran Methode transfiziert. Danach wurden die Zellen 5min mit Isoprenalin stimuliert. (Nachweis der Proteine und deren Phosphorylierung: vgl. Abb. 20.) Die gezeigten Bilder stehen für drei voneinander unabhängige Experimente. (A) und (B) haben dieselben EGFR- Reblots, da sie aus einem Experiment stammen. (\* signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle)

Da COS- 7- Zellen durch die Überexpression des EGFR ein künstlich geschaffenes Modell darstellen, sollte untersucht werden, ob solche Isoprenalin- induzierten Signalwege auch in Zellen auftreten, die einen endogen- überexprimierten EGFR aufweisen. Aus diesem Grund wurden A431- Zellen verwendet.

A431- Zellen wurden mit Isoprenalin stimuliert und die Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLCγ1, sowie die Phosphorylierung von EGFR- Y1173 und EGFR- Y845 untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass Isoprenalin, wie in EGFR- überexprimierenden COS- 7- Zellen, die Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 und die Phosphorylierung von EGFR- Y845 induzieren kann (Abb. 22B und 22C). Eine Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y1173 war auch in diesen Zellen nicht nachweisbar (Abb. 22D).

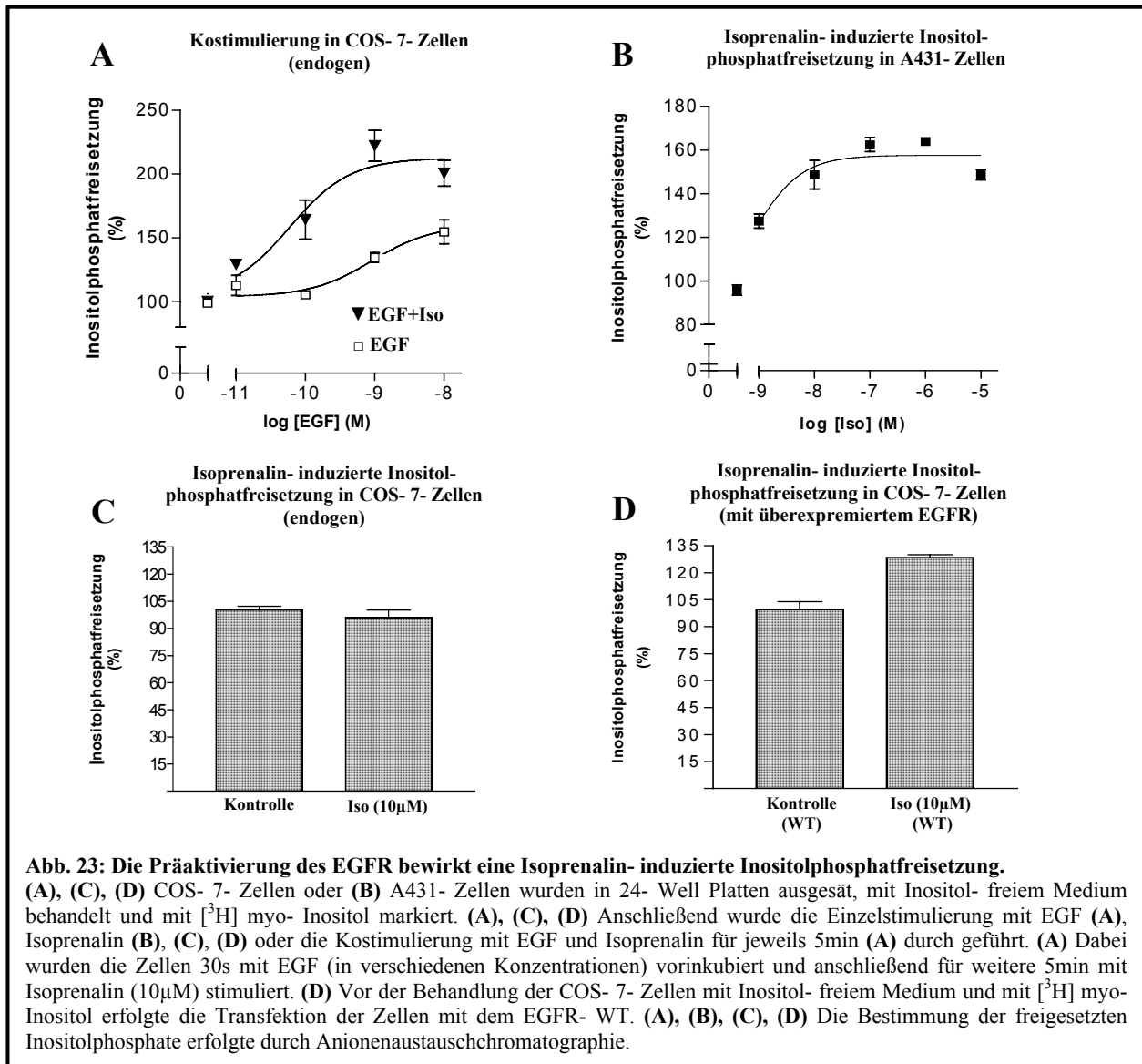


Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse (Abb. 20- 22), dass durch die Vorinkubation von COS- 7- Zellen mit EGF (mit endogen exprimiertem EGFR) und durch die Überexpression des EGFR Voraussetzungen geschaffen werden können, die zu einer Isoprenalin- induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845 und zur Aktivierung der PLCγ1 führen.

#### 4.2.5. Durch die Präaktivierung des EGFR kann eine Isoprenalin-induzierte Inositolphosphatfreisetzung bewirkt werden

Wie in Kapitel 4.2.3 und 4.2.4 gezeigt wurde, führt die Präaktivierung des EGFR zu einer Isoprenalin-induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1. Daher sollte geklärt werden, inwiefern die Zunahme der Tyrosinphosphorylierung auch mit einer Steigerung der PLCγ1- Aktivität korreliert. Daher wurde die Inositolphosphatfreisetzung nach Kostimulation in COS- 7- Zellen, in EGFR- über-exprimierenden COS- 7- Zellen sowie in A431- Zellen gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass Isoprenalin in COS- 7- Zellen mit endogen exprimierten EGFR, im Gegensatz zu EGF, keine Inositolphosphatfreisetzung induzieren kann (Abb. 23C). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass eine Einzelstimulierung dieser Zellen mit Isoprenalin weder die Aktivierung der PLCβ noch der PLCγ1 zur Folge haben kann. Die Kostimulation der Zellen mit EGF und Isoprenalin zeigte hingegen im Vergleich zur Einzelstimulierung mit EGF eine Zunahme der Inositolphosphatfreisetzung (Abb. 23A).

Wird der EGFR entweder durch Transfektion, wie in COS- 7- Zellen (Abb. 23D), oder endogen, wie in A431- Zellen (Abb. 23B) überexprimiert, so hat die Einzelstimulierung mit Isoprenalin eine Inositolphosphatfreisetzung zur Folge. Diese Ergebnisse lassen der Schluss zu, dass Isoprenalin nur in Verbindung mit einer erhöhten Tyrosinkinaseaktivität des EGFR eine Inositolphosphatfreisetzung induzieren kann.



Weiterhin kann gesagt werden, dass die Zunahme der Isoprenalin-induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1, die nur nach Kostimulation oder durch Überexpression des EGFR nachweisbar wird (Abb. 20- 22), mit der Zunahme ihrer Aktivität korreliert.

#### 4.2.6. Abhängigkeit der Isoprenalin-induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 von der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR

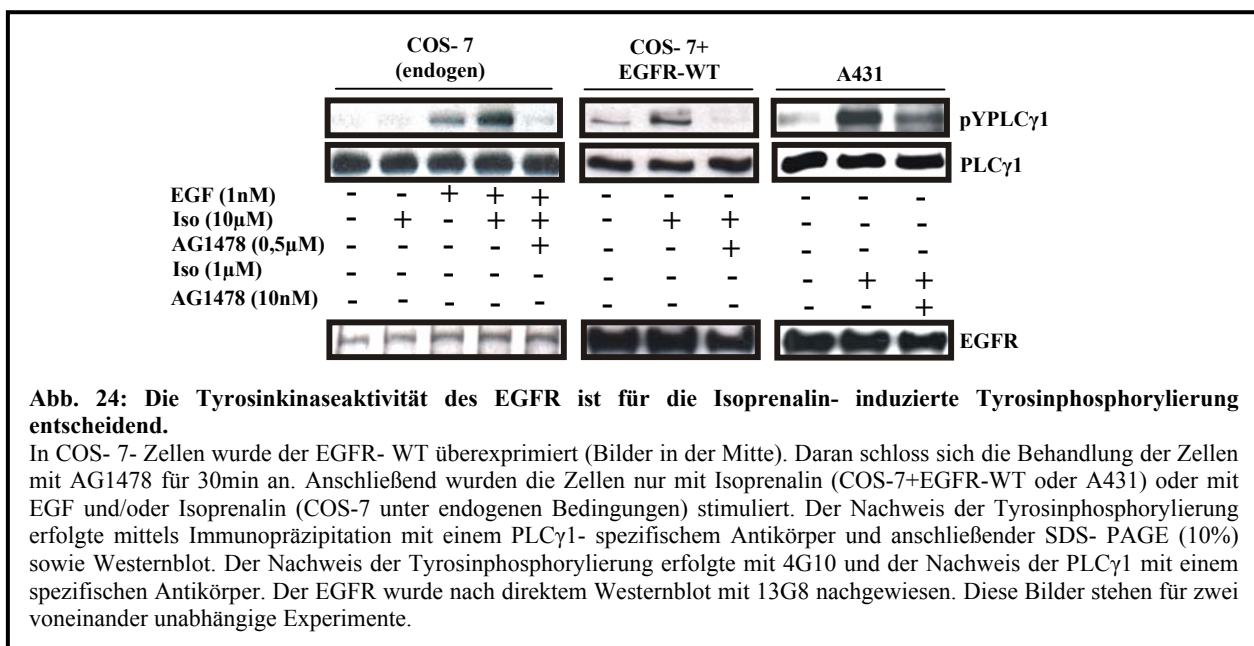
Da die Kostimulation der Zellen sowie die Überexpression des EGFR zu einer Isoprenalin-induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 führte, sollte im nächsten Schritt der dazugehörige Signalweg aufgeklärt werden. Als erstes wurde der Einfluss der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR in allen drei Systemen untersucht.

Dazu wurden COS- 7- Zellen mit AG1478 vorbehandelt, anschließend 30s mit EGF vorinkubiert und mit Isoprenalin kostimuliert. Im Fall der EGFR- überexprimierenden Zellen (COS- 7 + EGFR- WT und A431) erfolgte nach der Behandlung mit AG1478 die Einzelstimulierung mit Isoprenalin.

Dabei wurden A431- Zellen, im Gegensatz zu COS- 7- Zellen, mit einer Isoprenalin- Konzentration von 1 $\mu$ M stimuliert, da bei dieser Konzentration die maximale Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 erreicht wurde. Des weiteren konnte durch Vorarbeiten in A431- Zellen gezeigt werden, dass schon sehr geringe Konzentrationen von AG1478 ausreichend waren, um die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 zu unterdrücken (Ergebnis nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde, im Gegensatz zu COS- 7- Zellen, AG1478 in einer Konzentration von 10nM verwendet. Warum A431- Zellen im Gegensatz zu COS- 7- Zellen eine wesentlich erhöhte Sensitivität gegenüber diesem Inhibitor zeigen, ist nicht bekannt. Dieser Effekt könnte jedoch mit der sehr starken Überexpression des EGFR in A431- Zellen zusammenhängen.

Wie sich zeigte, hemmt AG1478 in allen drei Systemen die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 (Abb. 24). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass für die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR entscheidend ist.

Da bekannt ist, dass die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR über c- Src vermittelt wird, wurde auf eine nähere Untersuchung der Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGFR bei Anwesenheit des präaktivierten EGFR verzichtet. Anhand der Isoprenalin- induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845 unter diesen Bedingungen kann jedoch c- Src als Vermittler der Isoprenalin- induzierten Phosphorylierung des EGFR angesehen werden.



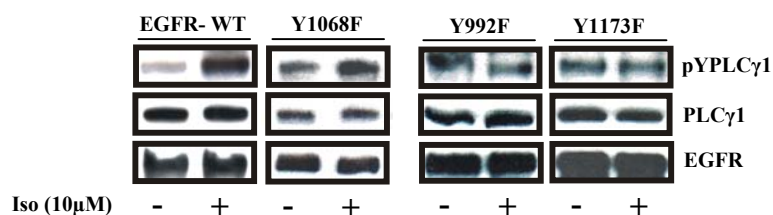
Um eine Bestätigung für die Beteiligung der EGFR- Tyrosinkinaseaktivität und der Andockstellen der PLC $\gamma$ 1 am EGFR (Y1173 und Y992) für die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 zu erhalten, wurden EGFR- Y992F oder EGFR- Y1173F in COS- 7- Zellen überexprimiert.

EGFR- Y1173 und EGFR- Y992 sind Autophosphorylierungsstellen des aktivierten EGFR und dienen darüber hinaus im phosphorylierten Zustand als Andockstellen für die PLC $\gamma$ 1 (Chattopadhyay et al., 1999). Wäre die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR tatsächlich an diesem Mechanismus beteiligt, so müsste die Transfektion dieser EGFR- Mutanten im Vergleich zum EGFR- WT zu einer Blockierung der Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 führen.

Als Negativkontrolle wurde EGFR- Y1068F überexprimiert. EGFR- Y1068 ist ein Tyrosinrest, der zwar auch als Autophosphorylierungsstelle des EGFR bekannt ist, jedoch nicht als Andockstelle für die PLC $\gamma$ 1, sondern für Grb2 dient. Die Überexpression dieser Mutante sollte demnach keinen Einfluss auf die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 haben.

In COS- 7- Zellen wurde der EGFR- WT oder EGFR- Y1173F, EGFR- Y992F sowie EGFR- Y1068F überexprimiert. Anschließend wurden die Zellen mit Isoprenalin stimuliert. Wie in Abb. 25 zu sehen ist, hatte die Überexpression von EGFR- Y1173F und EGFR- Y992F im Vergleich zur Überexpression des EGFR- WT und von EGFR- Y1068F keine Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 zur Folge. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR und die Andockstellen pY1173 und pY992 für die PLC $\gamma$ 1 am EGFR von entscheidender Bedeutung für die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 sind. Weiterhin bedeutet dies, dass dieser Mechanismus auf die EGFR- Y1173 und EGFR- Y992 begrenzt ist und daher sehr spezifisch über diese Tyrosinreste vermittelt wird.

Dieses Ergebnis steht scheinbar im Widerspruch zu den in Abb. 20- 22 dargestellten Resultaten, die zeigen, dass durch die Stimulierung mit Isoprenalin keine Phosphorylierung von EGFR- Y1173 induziert werden kann. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus Abb. 25 kann jedoch vermutet, dass die Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 durch Isoprenalin nicht über eine Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y1173, sondern möglicherweise über einen anderen, indirekten Signalweg erfolgt (nähere Erläuterungen in der **Diskussion**).



**Abb. 25: Die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 ist von EGFR- Y1173 und EGFR- Y992 abhängig.**

COS- 7- Zellen wurden mit dem EGFR-WT, EGFR-Y992F, EGFR-Y1173F und EGFR-Y1068F mittels DEAE- Dextran Methode transfiziert. Danach erfolgte die Stimulierung der Zellen 5min mit Isoprenalin. Die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 erfolgte mittels Immunopräzipitation mit einem PLC $\gamma$ 1- spezifischen Antikörper. Anschließend folgte die SDS- PAGE (10%) und der Westernblot. Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 erfolgte mit 4G10. Der Expressionsnachweis des überexprimierten EGFR erfolgte mittels direktem Westernblot und der anschließenden Behandlung der Membranen mit dem Antikörper 13G. Diese Bilder stehen für zwei voneinander unabhängige Experimente.

#### 4.2.7. Die Abhängigkeit der Isoprenalin-induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 von c-Src

Da die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung des EGFR und die nachfolgende Aktivierung von ERK1/2 durch c- Src vermittelt wird, sollte als nächstes geklärt werden, ob auch die Isoprenalin-induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 durch eine Src- Kinase vermittelt wird. Aus diesem Grund wurde der Inhibitor PP2 verwendet.

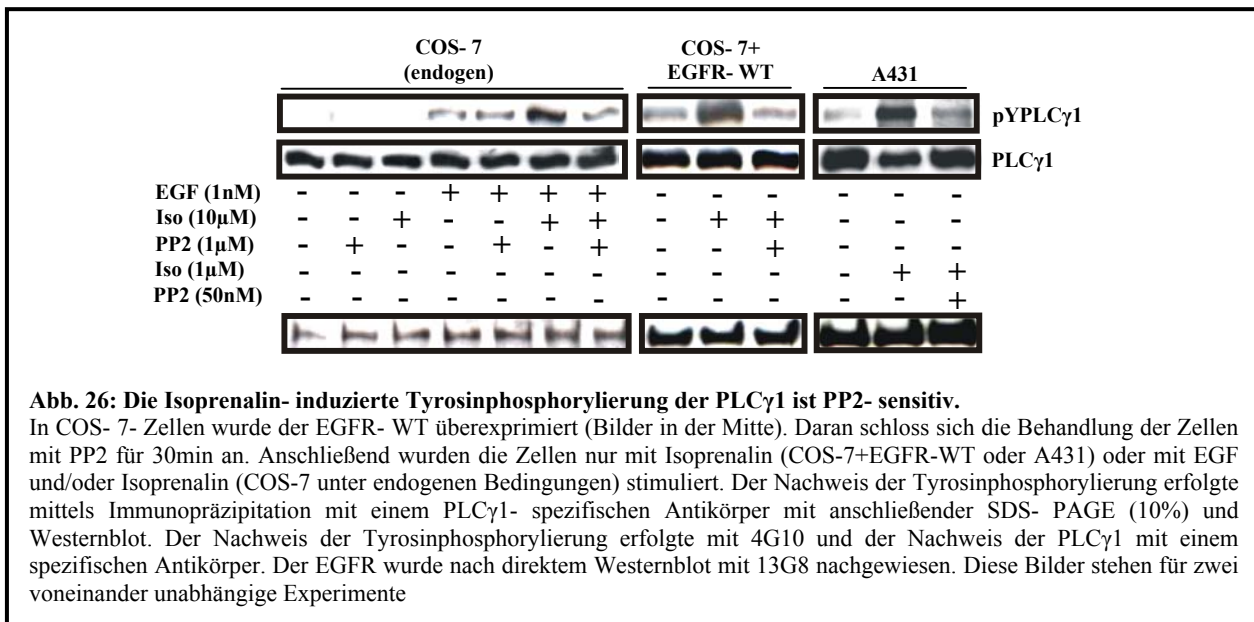
Dabei war für die Kostimulierungsexperimente wichtig, dass eine PP2- Konzentration verwendet wurde, die nur die zusätzliche Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 blockiert. In Vorexperimenten konnte gezeigt werden, dass die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und der anderen Signalwege erst ab einer PP2- Konzentration von 5 $\mu$ M signifikant gehemmt wird (Ergebnis nicht gezeigt). Isoprenalin- induzierte Signalwege wurden hingegen schon mit einer PP2- Konzentration von 1 $\mu$ M vollständig gehemmt (siehe Kapitel 4.1.2.; Abb. 8).

Aufgrund dieser unterschiedlichen PP2- Sensitivitäten der EGF- und Isoprenalin- induzierten Signalwege könnte es möglich sein, mit einer PP2- Konzentration von 1 $\mu$ M selektiv nur die zusätzlichen, durch Isoprenalin- vermittelten Effekte zu blockieren. Daher wurden COS- 7- Zellen mit PP2 (1 $\mu$ M) vorbehandelt und anschließend mit EGF und/oder Isoprenalin stimuliert.

Wie in Abb. 26 zu sehen ist, hemmte PP2 (1 $\mu$ M) in COS- 7- Zellen nicht die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1. Die Kostimulierung von COS- 7- Zellen erhöhte die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1. Diese Zunahme konnte durch die Behandlung der Zellen mit PP2 (1 $\mu$ M) gehemmt werden. PP2 senkte dabei die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 auf das Niveau herab, das durch die Einzelstimulierung der Zellen mit EGF hervorgerufen wird (Abb. 26).

In A431- Zellen und EGFR- überexprimierenden COS- 7- Zellen konnte die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 ebenfalls gehemmt werden (Abb. 26). Dabei wurden A431- Zellen mit PP2 (50nM) vorinkubiert und anschließend mit Isoprenalin stimuliert. Diese niedrige PP2 Konzentration wurde gewählt, da PP2 in A431- Zellen eine sehr hohe Effizienz bei der Hemmung der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 zeigt und in diesen Konzentrationen keine Eigenwirkung auf diesen Signalweg hat.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Isoprenalin- induzierte und von der Präaktivierung des EGFR abhängige Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 durch Src- Kinasen vermittelt wird.



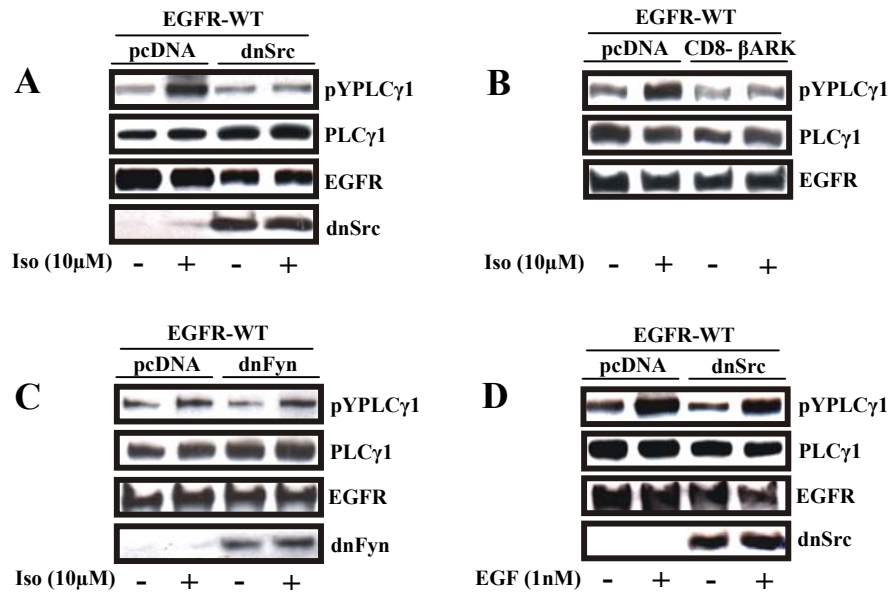
Durch die unspezifische Wirkung von PP2 innerhalb der Src- Kinasefamilie, wurde die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 mit dnSrc (K295R/Y527F) und der inaktiven Fyn- Mutante K299M untersucht. Dazu wurden COS- 7- Zellen mit pcDNA3, dem EGFR sowie dnSrc (K295R/Y527F) oder der inaktiven Fyn- Mutante K299M kotransfiziert und mit Isoprenalin stimuliert. Wie gezeigt wird, kann die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 durch dnSrc (K295R/Y527F) (Abb. 27A), nicht jedoch durch die inaktive Fyn- Mutante K299M (Abb. 27C) unterdrückt werden. Dies lässt darauf schließen, dass c- Src, aber nicht Fyn an diesem Mechanismus beteiligt ist. Als zusätzliches Beispiel sollte untersucht werden, inwiefern c- Src an der EGF- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 beteiligt ist.

Dazu wurden COS- 7- Zellen mit dem EGFR- WT und dnSrc (K295R/Y527F) kotransfiziert und mit EGF stimuliert. Es wurde festgestellt, dass die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung nicht durch dnSrc (K295R/Y527F) beeinflusst werden kann (Abb. 27D). Daraus ergibt sich dass c- Src nur an der Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 beteiligt ist.

Neben c- Src spielen auch βγ- Komplexe bei der Isoprenalin- induzierten Transaktivierung und der Aktivierung von ERK1/2 in COS- 7- Zellen eine wichtige Rolle (Crespo et al. 1995; Daaka et al. 1997). Dabei wird vermutet, dass c- Src über freigesetzte βγ- Komplexe aktiviert werden kann (Maudsley et al., 2000; Schmitt et al., 2002). Aus diesem Grund sollte der Einfluss der βγ- Komplexe bei der Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 untersucht werden. Die Zellen wurden daher mit dem EGFR- WT und dem βγ- Scavenger CD8- βARK transfiziert und anschließend mit Isoprenalin stimuliert.

Wie Abb. 27B zeigt, wird durch die Transfektion von CD8- βARK die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 unterdrückt und damit die Beteiligung der βγ- Komplexe nachgewiesen.





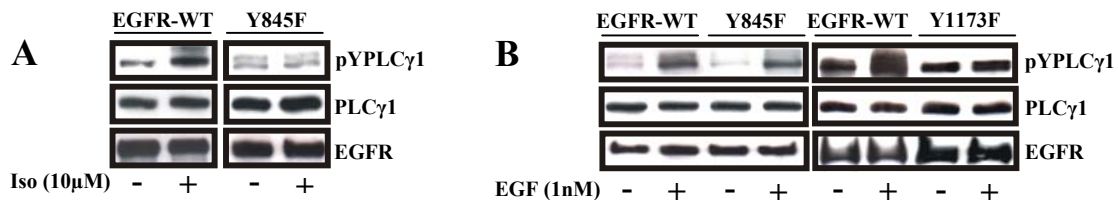
**Abb. 27: Die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 ist von βγ- Komplexen und von c- Src abhängig.**

(A), (B), (C), (D) COS- 7- Zellen wurden mit pcDNA3 (A), (B), (C), (D), dnSrc (K295R/Y527F) (A), (D), der inaktiven Fyn- Mutante K299M (C) oder CD8- βARK (B) nach der DEAE- Dextran Methode transfiziert. Danach wurden die Zellen mit Isoprenalin (10μM) (A), (B), (C) oder EGF (1nM) (D) für 5min stimuliert. Die Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 erfolgte mittels Immunopräzipitation mit einem PLCγ1- spezifischen Antikörper. Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 erfolgte mit 4G10. Der Expressionsnachweis des überexprimierten EGFR erfolgte mittels direktem Westernblot und der anschließenden Behandlung der Membranen mit dem Antikörper 13G8. Der Expressionsnachweis von dnSrc (A), (D) und der inaktiven Fyn- Mutante K299M (C) erfolgt durch direkten Westernblot mit den Antikörpern Mab327 (für dnSrc (K295R/Y527F)) und einem Fyn- spezifischen Antikörper (für K299M). Diese Bilder stehen für zwei voneinander unabhängige Experimente

#### 4.2.8. Die Abhängigkeit der Isoprenalin-induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 von EGFR- Y845

Wie durch die schon beschriebenen Experimenten festgestellt werden konnte, ist die Isoprenalin-induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 von c-Src abhängig. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Präaktivierung des EGFR Isoprenalin die Phosphorylierung von EGFR- Y845 induziert (Kapitel 4.2.3. und Kapitel 4.2.4.). Daher sollte untersucht werden, ob zwischen der Isoprenalin-induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845 und der Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 ein Zusammenhang existiert. Dazu wurde der EGFR- WT oder EGFR- Y845F in COS- 7- Zellen überexprimiert und die Zellen mit Isoprenalin oder EGF stimuliert. Es konnte festgestellt werden, dass EGFR- Y845F im Gegensatz zum EGFR- WT keine Isoprenalin-induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 vermitteln kann (Abb. 28A). Im Unterschied dazu zeigte EGFR- Y845F auf die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 keinen Einfluss (Abb. 28B). Um zu zeigen, dass im Gegensatz zu EGFR- Y845 die Autophosphorylierungsstelle EGFR- Y1173 bei der EGF- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 eine wichtige Rolle spielt, wurde EGFR- Y1173F in COS- 7- Zellen exprimiert. Wie aus Abb. 28B hervorgeht, wird die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1 durch die Überexpression EGFR- Y1173F blockiert. Dieses Ergebnis bestätigt die Rolle von EGFR- Y1173 bei der EGF- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1.

Demzufolge ist für die EGF- induzierte Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 die Autophosphorylierungsstelle EGFR- Y1173, nicht jedoch EGFR- Y845, entscheidend. Im Unterschied dazu spielt bei der Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1, neben den Autophosphorylierungsstellen EGFR- Y1173 und EGFR- Y992, auch EGFR- Y845 eine wichtige Rolle.

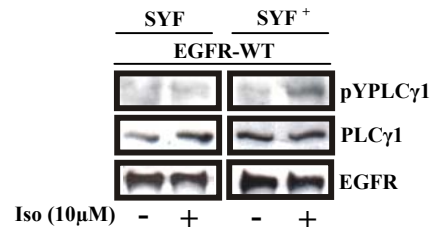


**Abb. 28: Die Isoprenalin-, nicht jedoch die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 ist von EGFR- Y845 abhängig.**

(A), (B) COS- 7- Zellen wurden mit dem EGFR- WT (A), (B), EGFR- Y845F (A), (B) oder EGFR- Y1173F (B) nach der DEAE- Dextran Methode transfiziert. Danach wurden die Zellen 5min mit Isoprenalin (10 $\mu$ M) (A) oder EGF (1nM) (B) stimuliert. Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 erfolgte mittels Immunopräzipitation mit einem PLC $\gamma$ 1-spezifischen Antikörper. Anschließend folgte die SDS- PAGE (10%) und der Westernblot. Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 erfolgte mit 4G10. Der Expressionsnachweis des überexprimierten EGFR erfolgte ohne Immunopräzipitation mit direktem Westernblot und der anschließenden Behandlung der Membranen mit dem Antikörper 13G8. Diese Bilder sind repräsentativ für zwei Experimente.

Um neben der Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren und der Überexpression von dominant- negativen Proteinen auch einen molekulargenetischen Beweis für diesen Signalweg zu erhalten, wurden SYF und SYF<sup>+</sup>- Zellen verwendet. Diese beiden Zelllinien haben den Vorteil, dass der Einfluss von c- Src ohne Transfektion von dnSrc (K295R/Y527F) und ohne die Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren untersucht werden kann. Da Src- defiziente SYF- Zellen keine Src- Kinasen exprimieren, wurde angenommen, dass Isoprenalin in EGFR- überexprimierenden SYF- Zellen keine Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 induzieren kann. In SYF<sup>+</sup>- Zellen sollte hingegen durch die Überexpression des EGFR eine Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 nachweisbar sein.

Dazu wurde in den beiden Zelllinien der EGFR- WT überexprimiert und anschließend mit Isoprenalin stimuliert. Wie Abb. 29 zeigt, kann durch Isoprenalin in SYF- Zellen mit überexprimiertem EGFR die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 nicht induziert werden. In EGFR- überexprimierenden SYF<sup>+</sup>- Zellen konnte hingegen eine Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 nachgewiesen werden. Diese Resultate bestätigen die Bedeutung von c- Src und dem präaktivierten EGFR bei der Isoprenalin- induzierten Aktivierung der PLC $\gamma$ 1.



**Abb. 29: Die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 ist in SYF- Zellen von c- Src abhängig.**

SYF- Zellen wurden nach der Lipofectamin- Methode mit dem EGFR- WT transfiziert. Anschließend folgte die Stimulierung mit Isoprenalin für 5min. Die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 erfolgte mittels Immunopräzipitation mit einem PLC $\gamma$ 1- spezifischen Antikörper. Nach SDS- PAGE (10%) und Westernblot erfolgte der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 mit 4G10. Der Expressionsnachweis des EGFR wurde mittels direktem Westernblot und dem Antikörper 13G8 durchgeführt. Dieses Bild ist repräsentativ für zwei Experimente.

#### 4.2.9. Die Abhängigkeit der Isoprenalin-induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 vom Dimerisierungszustandes des EGFR

Die EGF- induzierte Dimerisierung des EGFR ist ein gut untersuchter und durch eine Vielzahl von Methoden bestätigter Mechanismus (Garrett et al., 2002; Walker et al., 2004). In den nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, inwiefern die Dimerisierung des EGFR bei der Isoprenalin-induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 von Bedeutung ist. Dazu wurde eine EGFR- Mutante verwendet, die nach Bindung von EGF nicht dimerisieren und somit auch keine EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 und der PKB/Akt vermitteln werden kann (Garrett et al., 2002; Walker et al., 2004).

Diese Mutante wurde hergestellt, indem die Dimerisierungsschleife in der CR1- Subdomäne des extrazellulären Abschnittes des EGFR deletiert wurde ( $\Delta$ CR1) (Garrett et al., 2002). Diese Eigenschaften machen es möglich, den Einfluss der Dimerisierung des EGFR auch bei der GPCR- vermittelten Signaltransduktion zu untersuchen. Daher wurde in COS- 7- Zellen der EGFR-  $\Delta$ CR1 oder der EGFR- WT überexprimiert und mit Isoprenalin stimuliert. Anschließend wurde der Einfluss dieser Mutante auf die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung des EGFR, die Phosphorylierung von EGFR- Y845, die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 sowie die Aktivierung von ERK1/2 untersucht.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass die Überexpression des EGFR-  $\Delta$ CR1 und EGFR- WT eine vergleichbar starke basale Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der Phosphorylierung von EGFR- Y845 hervorrufen (Abb. 30). Dieses Ergebnis war überraschend, da aufgrund der fehlenden Fähigkeit zur Dimerisierung vermutet wurde, dass die Überexpression des EGFR-  $\Delta$ CR1 keine erhöhten basalen Phosphorylierungen zur Folge hat. Da diese Mutante jedoch noch katalytisch aktiv ist, kann vermutet werden, dass auch durch deren Überexpression zufällige und unspezifische Wechselwirkungen hervorgerufen werden, die zu verstärkten Tyrosinphosphorylierungen der EGFR-  $\Delta$ CR1- Monomere untereinander führen.

Dass diese zufälligen Wechselwirkungen der EGFR-  $\Delta$ CR1- Monomere im Vergleich zur Überexpression des EGFR- WT jedoch nicht zur Ausbildung von funktionellen Dimeren zu führen scheint, konnte durch die Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 gezeigt werden.

Wie sich im Vergleich zu Zellen mit überexprimiertem EGFR- WT zeigte, ist die basale Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 in Zellen mit überexprimiertem EGFR-  $\Delta$ CR1 sehr stark herabgesenkt (Abb. 30). Das bedeutet, im Gegensatz zur Überexpression des EGFR- WT, dass durch die Überexpression des EGFR-  $\Delta$ CR1 keine Erhöhung der basalen Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 induziert werden kann.

Dies bestätigt, dass durch die Überexpression des EGFR- WT aktivierte EGFR- Dimere entstehen, die in der Lage sind, die PLC $\gamma$ 1 zu phosphorylieren. Dadurch wird im Vergleich zu COS- 7- Zellen mit endogen exprimiertem EGFR eine sehr stark erhöhte basale Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 induziert (Abb. 19).

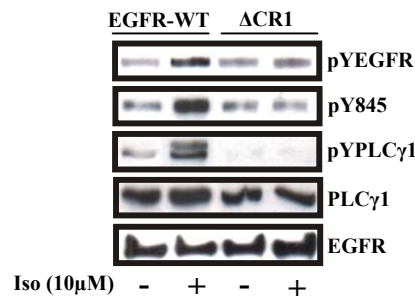
Wird hingegen der EGFR-  $\Delta$ CR1 überexprimiert, so scheinen keine funktionellen EGFR- Dimere zu entstehen. Dies hat zur Folge, dass die PLC $\gamma$ 1 nicht phosphoryliert werden kann. Dadurch wird die Zunahme der basalen Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 verhindert.

Zusammengefasst kann geschlussfolgert werden, dass durch die Überexpression des EGFR-  $\Delta$ CR1 unspezifische Wechselwirkungen und Phosphorylierungen auftreten, die jedoch nicht, wie bei der Überexpression des EGFR- WT, durch die Bildung funktioneller Dimere hervorgerufen werden, sondern unspezifischer Natur sind.

Betrachtet man die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung des EGFR, die Phosphorylierung von EGFR- Y845 und die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 in EGFR- WT- und EGFR-  $\Delta$ CR1- überexprimierenden Zellen, so wird deutlich, dass durch die Überexpression von EGFR-  $\Delta$ CR1 diese Signalwege vollständig unterdrückt werden (Abb. 30).

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung, die Phosphorylierung von EGFR- Y845 sowie die Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 vom Dimerisierungsgrad des EGFR abhängig sind.

Dabei spielt die Präaktivierung, d.h. die Ausbildung funktioneller EGFR- Dimere, für die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und der Phosphorylierung von EGFR- Y845 eine essentielle Rolle. Wird der EGFR-  $\Delta$ CR1 überexprimiert so wird die Ausbildung aktivierter EGFR- Dimere verhindert. Dadurch ist die Voraussetzung für eine Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 und daher auch für die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 nicht gegeben.



**Abb. 30: Die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung ist abhängig von der Dimerisierung des EGFR.**

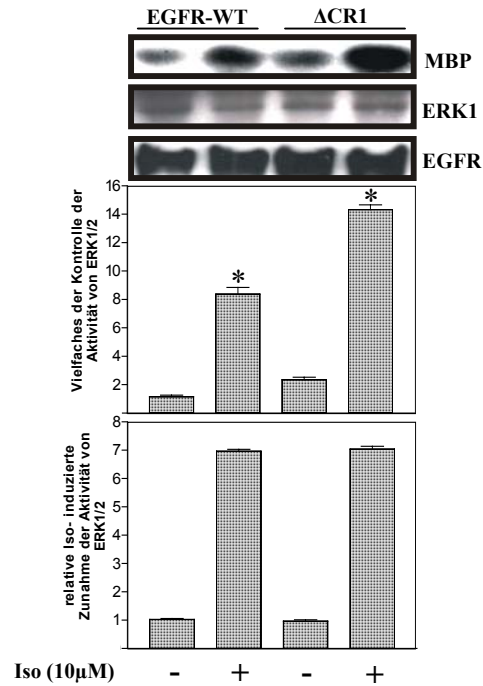
COS- 7- Zellen wurden mit der EGFR- Mutante  $\Delta$ CR1 transfiziert. Anschließend wurden die Zellen 5min mit Isoprenalin stimuliert. Der Nachweis der pYPLC $\gamma$ 1 erfolgte mittels Immunopräzipitation mit einem PLC $\gamma$ 1- spezifischen Antikörper. Nach SDS- PAGE (10%) und Westernblot wurde die Tyrosinphosphorylierung mit 4G10 untersucht. Der Reblot erfolgte mit einem PLC $\gamma$ 1- spezifischen Antikörper. Die Bestimmung von pYEGFR und pY845 erfolgte im direkten Westernblot mit den Antikörper 4G10 (für pYEGFR) und 12A3 (für pY845). Der Überexpressionsnachweis des EGFR erfolgte mit direktem Westernblot mit dem Antikörper 13G8. Diese Bilder stehen für zwei voneinander unabhängige Experimente.

Als nächstes sollte der Einfluss der Dimerisierung des EGFR auf die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 untersucht werden. Aus diesem Grund wurde in COS- 7- Zellen der EGFR-  $\Delta$ CR1 überexprimiert und die Zellen mit Isoprenalin stimuliert.

Vergleicht man die Ergebnisse der Expression des EGFR- WT mit der Überexpression des  $\Delta$ CR1- EGFR, so fällt auf, dass die Transfektion des EGFR-  $\Delta$ CR1 zu einer Verdopplung der basalen Aktivität von ERK1/2 führte (Abb. 31). Darüber hinaus war auch die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 in Zellen mit überexprimiertem EGFR-  $\Delta$ CR1 doppelt so hoch wie in Zellen mit überexprimiertem EGFR- WT (Abb. 31). Wodurch diese Erhöhung vermittelt wird, ist unklar. Eine Ursache könnte jedoch die Aufhebung der intramolekularen Autoinhibition (durch die Deletion von  $\Delta$ CR1 hervorgerufen) sein.

Entscheidend ist jedoch, dass Isoprenalin in EGFR-  $\Delta$ CR1- und EGFR- WT- überexprimierenden Zellen eine 7-fach höhere Aktivität von ERK1/2 (im Vergleich zu den basalen Werten) induziert (Abb. 31). Damit ist die relative Isoprenalin- induzierte Aktivität von ERK1/2 in EGFR-  $\Delta$ CR1- überexprimierenden Zellen genauso hoch wie in EGFR- WT- überexprimierenden Zellen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Überexpression des EGFR-  $\Delta$ CR1 keine Blockierung der Isoprenalin- induzierten Aktivierung von ERK1/2 zur Folge hat. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 unabhängig von der Dimerisierung des EGFR vermittelt werden kann (nähere Erläuterungen in der **Diskussion**).

Untersuchungen der M2- Rezeptor- vermittelten Aktivierung von ERK1/2 in COS- 7- Zellen zeigten hingegen, dass Carbachol in EGFR-  $\Delta$ CR1- überexprimierenden Zellen im Vergleich zu EGFR- WT- überexprimierenden Zellen nur noch eine schwache Aktivierung von ERK1/2 induzieren kann (*Dissertation J. Stirnweiss*). Dies deutet daraufhin, dass, im Gegensatz zur Isoprenalin- induzierten Aktivierung von ERK1/2, die M2- Rezeptor- vermittelte Aktivierung von ERK1/2 von der Dimerisierung des EGFR abhängig ist.



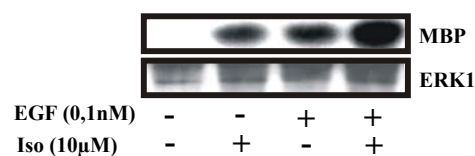
**Abb. 31: Die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 ist unabhängig von der Dimerisierung des EGFR.**

COS- 7- Zellen wurden mit dem EGFR- WT oder der EGFR- Mutante  $\Delta$ CR1 transfiziert. Die Zellen wurden 5min mit Isoprenalin (10 $\mu$ M) stimuliert. Die Aktivitätsbestimmung von ERK1/2 erfolgte durch den MAPK- Assay. Der Überexpressionsnachweis des EGFR- WT oder von EGFR-  $\Delta$ CR1 erfolgte mit direktem Westernblot und der Behandlung der Membranen mit dem Antikörper 13G8. Diese Bilder stehen für zwei voneinander unabhängige Experimente mit 3-fach Bestimmungen. (\* signifikant erhöht gegenüber der jeweiligen Kontrolle)

### 4.3. Durch die Kostimulation wird eine partiell Ras-unabhängige Aktivierung von ERK1/2 induziert

In den vorangegangenen Abschnitten wurde untersucht, ob und unter welchen zellulären Bedingungen Isoprenalin die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 induzieren kann. Als nächstes sollten am Beispiel der Kostimulation mit EGF und Isoprenalin die Auswirkungen der Präaktivierung des EGFR auf die Aktivierung von ERK1/2 untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit EGF und/oder Isoprenalin stimuliert. Wie Abb. 32 zeigt, werden durch die Stimulation mit Isoprenalin oder mit submaximalen EGF- Konzentrationen (0,1nM) ähnliche ERK1/2- Aktivitäten induziert. Werden die Zellen mit EGF (0,1nM) und Isoprenalin kostimuliert, so addieren sich die beiden Einzeleffekte.

Die submaximale EGF- Konzentration (0,1nM) wurde gewählt, da in Vorexperimenten durch die Stimulierung mit höheren EGF- Konzentrationen die additive Zunahme der Aktivität von ERK1/2 nach Kostimulation überdeckt wurde (Ergebnis nicht gezeigt).



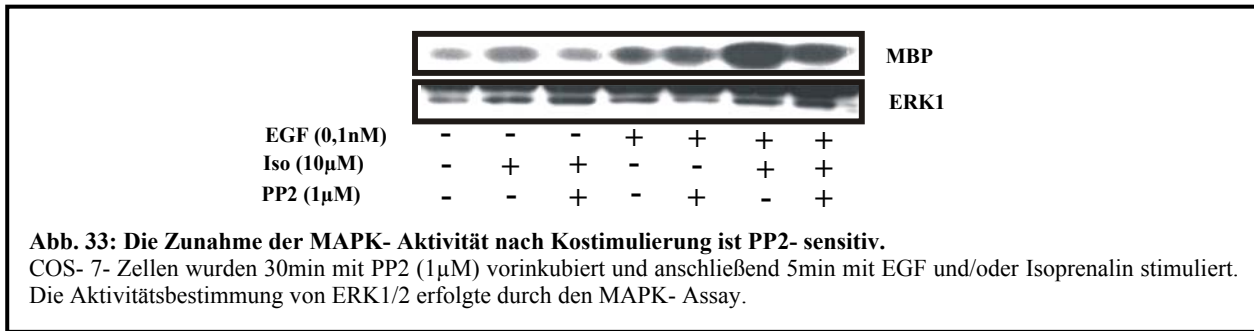
**Abb. 32: Die Kostimulation der Zellen verursacht eine Zunahme der MAPK- Aktivität.**

COS- 7- Zellen wurden mit EGF und/oder Isoprenalin für 5min stimuliert. Die Aktivitätsbestimmung von ERK1/2 erfolgte durch den MAPK- Assay.

Anschließend sollte der Signalweg untersucht werden, der die Zunahme der Aktivität von ERK1/2 nach Kostimulation bewirkt. Zunächst wurde der Einfluss von Src- Kinasen unter Verwendung des Src- Kinase- spezifischen Inhibitors PP2 untersucht. Wie Vorarbeiten zeigten, wird die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 mit einer PP2- Konzentration von 1µM gehemmt (siehe Kapitel 4.1.2., Abb. 8). Die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 ließ sich hingegen erst mit einer PP2- Konzentration von 5µM signifikant hemmen (siehe Kapitel 4.1.2., Abb. 8). Somit lassen sich mit einer PP2- Konzentration von 1µM selektiv nur Isoprenalin- induzierten Signalwege blockieren.

Abb. 33 bestätigt diese Selektivität. So ließ sich mit PP2 (1µM) nur die Isoprenalin- induzierte, nicht jedoch die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 hemmen. Die Kostimulation der Zellen mit EGF und Isoprenalin führte erwartungsgemäß zu einer additiven Zunahme der Aktivität von ERK1/2. Durch die Vorinkubation mit PP2 (1µM) wurde diese additive Zunahme auf das Niveau herabgesetzt, das durch die Einzelstimulierung mit EGF induziert wurde. Aus diesem Ergebnis kann gefolgert werden, dass die zusätzliche Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 durch Src- Kinasen vermittelt wird.



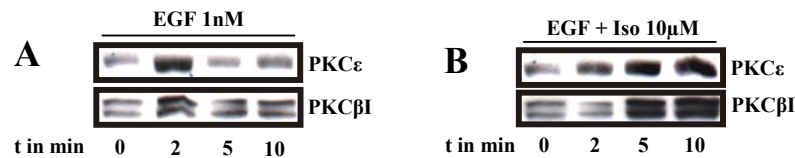


Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass sich die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 nach Kostimulation ähnlich verhält. So konnte durch Kostimulation eine Zunahme der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 induziert werden. Unter Verwendung von PP2 war es möglich, diese Zunahme wieder auf das Niveau der Einzelstimulierung mit EGF zu reduzieren (Kapitel 4.2.7., Abb. 26). Durch diese Ähnlichkeiten, die die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und die Aktivität von ERK1/2 nach Kostimulation aufweisen, wurde ein Zusammenhang zwischen beiden Ereignissen vermutet. Dabei wurde angenommen, dass die additive Zunahme der Aktivität von ERK1/2 möglicherweise auf die Erhöhung der PLC $\gamma$ 1- Aktivität nach Kostimulation zurückgeführt werden kann (Kapitel 4.2.5., Abb. 23A) und somit über einen PKC- abhängigen Signalweg vermittelt wird. Aus diesem Grund wurde zunächst untersucht, ob durch die Kostimulation Veränderungen bei der Translokation der verschiedenen PKC- Isoformen induziert werden.

COS- 7- Zellen exprimieren die PKC $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\zeta$ . Die PKC  $\theta$ ,  $\delta$ , und  $\gamma$  werden hingegen nicht exprimiert (Adomeit et al., 1999). Als nächstes wurde die PKC- Translokation untersucht, die nach Einzelstimulierung mit EGF stattfindet. Dazu wurden COS- 7- Zellen unterschiedlich lange mit EGF stimuliert. Wie Abb. 34A zeigt, werden insbesondere die PKC $\epsilon$  und die PKC $\beta$ I zeitabhängig zur Zellmembran translokalisiert. Es konnte festgestellt werden, dass in den ersten Minuten der Stimulierung mit EGF das Maximum der Translokation der PKC $\epsilon$  und  $\beta$ I erreicht wird. Wurde die Stimulierung für 5min durchgeführt, so konnte keine EGF- induzierte Translokation dieser PKC- Isoformen mehr nachgewiesen werden (Abb. 34A). Dies bedeutet, dass die EGF- induzierte Translokation zeitlich sehr begrenzt ist. Daher kann vermutet werden, dass der Einfluss der PKCs auf die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 bei längerer Stimulationszeit (ab 5min) sehr gering ist. Ob und wie groß der Einfluss der PKCs auf die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 und anderer Signalwege bei kurzzeitiger Stimulationszeit (nach 2min) ist, wurde nicht näher untersucht. Isoprenalin konnte hingegen keine Translokation der hier aufgeführten PKC- Isoformen induzieren (Ergebnis nicht gezeigt).

Wurden die Zellen kostimuliert, so ergab sich für die Translokation der PKC $\epsilon$  und  $\beta$ I eine andere Kinetik. Die Translokation verlief unter diesen Bedingungen offenbar langsamer und über einen längeren Zeitraum hinweg, so dass das Maximum erst bei einer Stimulationsdauer von 5min erreicht wurde (Abb. 34B). Durch die längere Verweildauer der PKCs an der Zellmembran kann somit vermutet werden, dass die PKCs erst unter diesen Bedingungen in die Aktivierung von ERK1/2 involviert sein könnten.

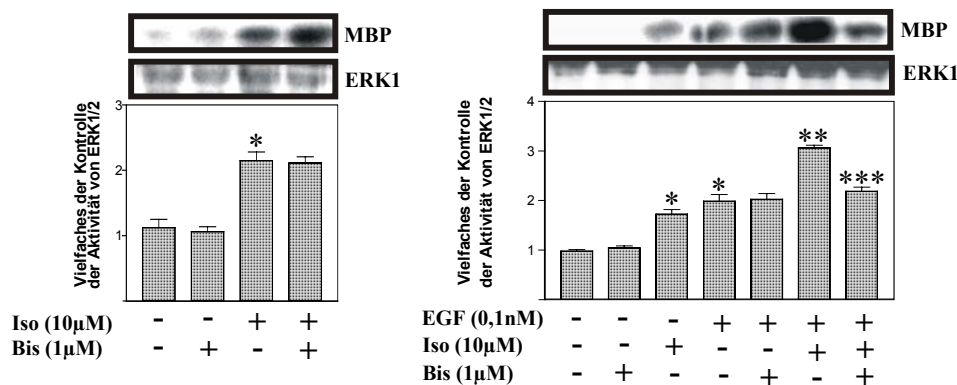




**Abb. 34: Die Kostimulation verändert die Kinetik der PKC- Translokation.**

(A), (B) COS- 7- Zellen wurden entweder mit EGF (1nM) einzelstimuliert (A) oder mit EGF (1nM) und Isoprenalin (10µM) kostimuliert (B). Es folgte die Homogenisierung und Zentrifugation. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung nach Lowry und die SDS- PAGE (7,5%) mit nachfolgendem Westernblot. Die Entwicklung der Membran erfolgte mit den jeweiligen PKC- spezifische Antikörpern. Diese Bilder stehen für zwei voneinander unabhängige Experimente.

Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde der Einfluss eines PKC- Inhibitors auf die Aktivität von ERK1/2 nach Kostimulation untersucht. Dazu wurde Bisindolylmaleimid verwendet, das unspezifisch verschiedene PKC- Isoformen hemmt. Es erfolgte eine Vorinkubation der Zellen mit Bisindolylmaleimid (Bis) und die anschließende Stimulierung mit EGF und/oder Isoprenalin. Die Einzelwege, die zur Aktivierung von ERK1/2 führen, sind Bisindolylmaleimid- insensitiv. Dies bedeutet, dass keine PKC in die Isoprenalin- (Crespo et al., 1995; Maudslay et al., 2000) und in die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 involviert ist. Wurden die Zellen jedoch mit Bisindolylmaleimid vorinkubiert und anschließend mit EGF und Isoprenalin kostimuliert, wurde die additive Zunahme der ERK1/2- Aktivität auf das Niveau herabgesetzt, das durch die Einzelstimulierung mit EGF oder Isoprenalin induziert werden kann (Abb. 35). Dieses Ergebnis konnte auch durch Downregulation der PKCs mit PMA bestätigt und verifiziert werden (Ergebnis nicht gezeigt).

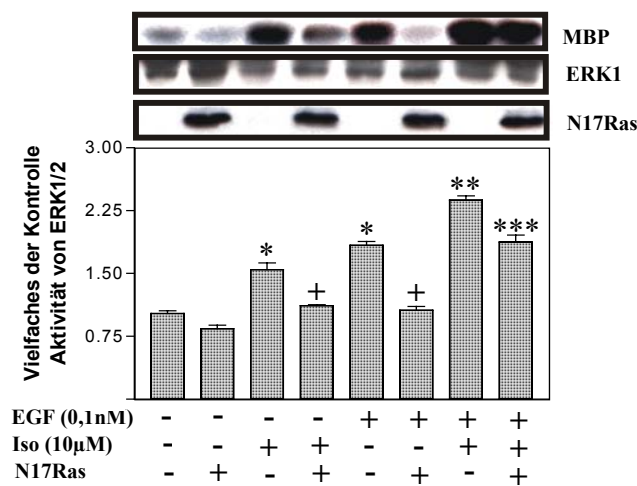


**Abb. 35: Die Zunahme der MAPK- Aktivität nach Kostimulation ist Bisindolylmaleimid- sensitiv.**

COS- 7- Zellen wurden 30min mit Bisindolylmaleimid (1µM) vorinkubiert. Dann wurden die Zellen 5min mit EGF und/oder Isoprenalin stimuliert. Die Aktivitätsbestimmung von ERK1/2 erfolgte durch den MAPK- Assay. Diese Bilder stehen für zwei voneinander unabhängige Experimente. (\* signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle; \*\* signifikant erhöht gegenüber den Einzelstimulierungen; \*\*\* signifikant reduziert gegenüber der Kostimulation)

Wie diese Experimente belegen, wird die additive Aktivierung von ERK1/2 über einen PKC- vermittelten Mechanismus induziert. Da vor allem die PKC $\epsilon$  oder PKC $\beta$ I nach Kostimulation eine veränderte Translokation aufweisen, kann vermutet werden, dass dieser Mechanismus durch eine dieser beiden PKC- Isoformen vermittelt wird. Welche der beiden PKCs an diesem Mechanismus beteiligt ist, könnte durch inaktive PKC- Mutanten oder durch die Verwendung der jeweiligen siRNA ermittelt werden.

Es ist bekannt, dass PKCs ERK1/2 über einen Ras- unabhängigen Mechanismus aktivieren können (Schönwasser et al., 1998). Daher sollte der Einfluss von Ras bei Kostimulation mit der dominant-negativen Ras- Mutante N17Ras in COS- 7- Zellen untersucht werden. Wie Abb. 36 zeigt, wurde durch die Überexpression von N17Ras die Isoprenalin- sowie die EGF- induzierte ERK1/2- Aktivierung blockiert. Bei Kostimulation zeigte N17Ras nur noch einen partiellen Einfluss auf die Aktivität von ERK1/2. Dabei ging die Aktivität von ERK1/2 nach Kostimulation auf das Niveau zurück, das durch die Einzelstimulierung mit EGF oder Isoprenalin induziert wurde. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass sowohl ein Ras- abhängiger als auch ein Ras- unabhängiger Signalweg die additive Zunahme der Aktivität von ERK1/2 nach Kostimulation vermittelt (nähere Erläuterungen in der **Diskussion**).



**Abb. 36: Die Zunahme der MAPK- Aktivität nach Kostimulation ist teilweise unabhängig von Ras.**

In COS- 7- Zellen wurde N17Ras überexprimiert. Die Zellen wurden mit EGF und/oder Isoprenalin stimuliert. Die Aktivitätsbestimmung von ERK1/2 erfolgte durch den MAPK- Assay. Der Nachweis von N17Ras erfolgte durch direkten Westernblot mit dem Antikörper anti- pan- Ras. Diese Bilder stehen für zwei voneinander unabhängige Experimente. (\* signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle; \*\* signifikant erhöht gegenüber den Einzelstimulierungen; + signifikant reduziert gegenüber der Einzelstimulierung; \*\*\* signifikant reduziert gegenüber der Kostimulation)

Offen bleibt hingegen die Frage, welchen Einfluss die PLC $\gamma$ 1 auf die additive Zunahme der Aktivität von ERK1/2 nach Kostimulation hat. Der direkte Beweis fehlt, könnte jedoch mit einem PLC- spezifischen Inhibitor oder durch eine inaktive PLC $\gamma$ 1 erbracht werden. Weiterhin ist unbekannt, inwiefern dieser Ras- unabhängige aber PKC- abhängige Signalweg auch auf EGFR- überexprimierende Zellen zutrifft. Da jedoch die Kostimulation und auch die Überexpression des EGFR zu einer Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 führte, könnte auch in EGFR- überexprimierenden Zellen ein Isoprenalin- induzierter, Ras- unabhängiger aber PKC- vermittelter Signalweg zur Aktivierung von ERK1/2 vermutet werden.

#### 4.4. c-Src und Fyn als spezifische Vermittler GPCR-, nicht jedoch EGFR-induzierter mitogener Signalwege in COS- 7- Zellen

Vergleich der Wirkung von PP2 mit der Überexpression von inaktiven Src- Mutanten

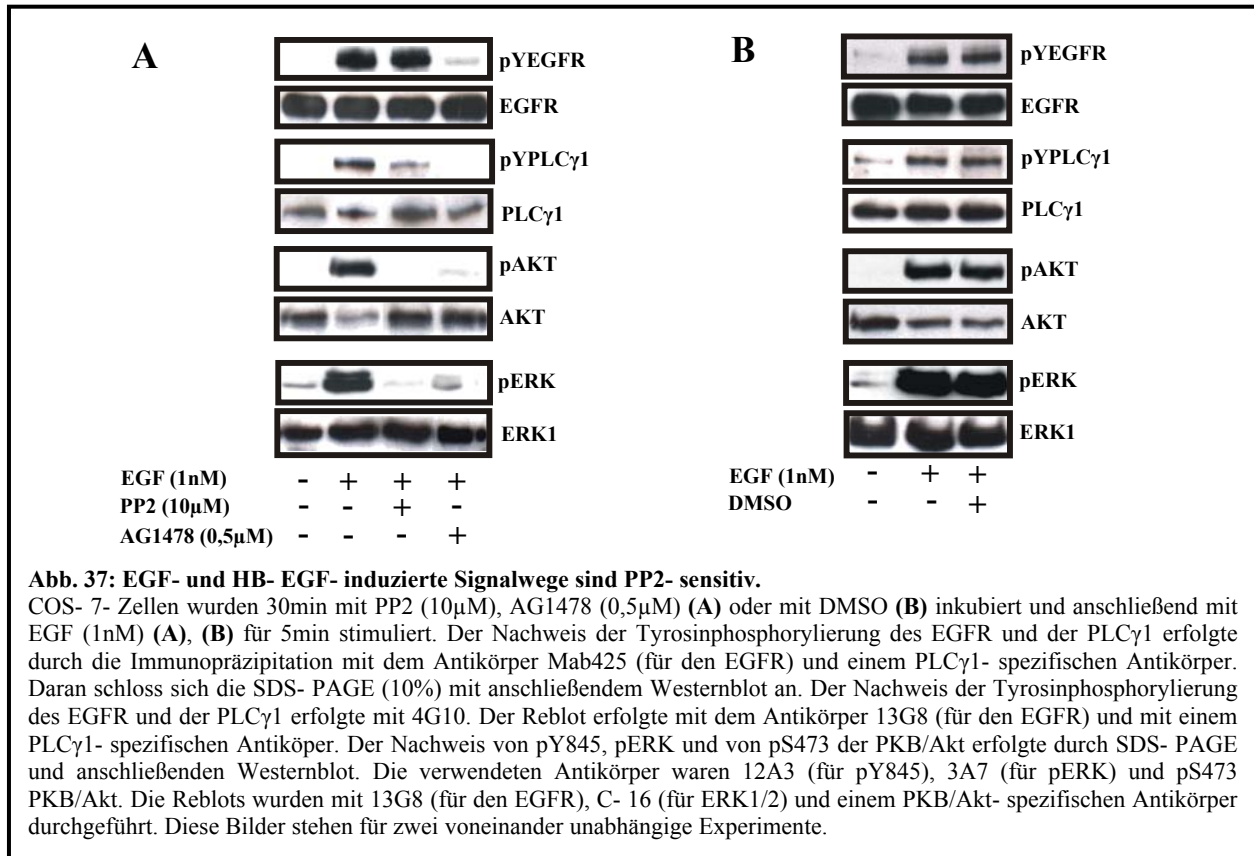
In den vorangegangenen Abschnitten wurde untersucht, ob die Präaktivierung des EGFR dazu führt, dass durch Isoprenalin zusätzliche Signalwege induziert werden können. Es konnte herausgefunden werden, dass erst durch die Präaktivierung am EGFR Bedingungen geschaffen werden, die eine Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 und die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 ermöglichen. Dabei spielt c- Src eine entscheidende Rolle. Bei der EGF- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 scheint hingegen c- Src keine Rolle zu spielen (Abb. 27D). Dies lässt darauf schließen, dass c- Src spezifisch nur ganz bestimmte Signalwege in Abhängigkeit des stimulierten Rezeptors vermittelt. Daher sollte an dieser Stelle der Einfluss von c- Src auf weitere mitogene EGF- und GPCR- vermittelte Signalwege untersucht werden. Dazu wurden verschiedene experimentelle Ansätze, wie die Verwendung von PP2, die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) und die Verwendung von SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen, gewählt und miteinander verglichen. Zunächst sollte die c- Src- Abhängigkeit der EGF- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 sowie die Aktivierung der PKB/Akt und von ERK1/2 unter endogenen Bedingungen in COS- 7- Zellen untersucht werden.

##### 4.4.1. Widersprüchliche Ergebnisse bei der Verwendung von PP2 und dnSrc-Kinasevarianten bei EGF- induzierten Signalwegen in COS-7-Zellen

PP2 wurde verwendet, um einen ersten Einblick in die Beteiligung von Src- Kinasen bei EGF- induzierten Signalwegen, wie der Aktivierung der PLC $\gamma$ 1, der PKB/Akt und von ERK1/2, zu erlangen. Zunächst wurde durch eine PP2- Konzentrationsreihe festgestellt, dass EGF- induzierte Signalwege, wie die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1, die Aktivierung von ERK1/2 und die Phosphorylierung von S473 der PKB/Akt, ab einer PP2- Konzentration von 5 $\mu$ M signifikant (um etwa 50%) und bei einer Konzentration von 10 $\mu$ M vollständig gehemmt werden (Ergebnis nicht gezeigt). Niedrigere PP2- Konzentrationen zeigten hingegen keine Wirkung auf diese Signalwege. Da in vielen Veröffentlichungen mit einer PP2- Konzentration von 10 $\mu$ M gearbeitet wurde, sind in Abb. 37A auch nur die Ergebnisse mit dieser PP2- Konzentration abgebildet.

Die EGF- induzierte Autophosphorylierung des EGFR ist PP2- insensitiv. Die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 kann hingegen teilweise und die Phosphorylierung der PKB/Akt und von ERK1/2 vollständig durch PP2 (10 $\mu$ M) blockiert werden. Als Vergleich wurde der Einfluss der Rezeptortyrosinkinaseaktivität des EGFR auf die oben genannten EGF- induzierten Signalwege mit Hilfe von AG1478 untersucht. Wie sich bestätigte, sind alle EGF- induzierten Signalwege von der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR abhängig (Abb. 37A). Um zusätzlich den Einfluss des Lösungsmittels DMSO abschätzen zu können, worin die Inhibitoren PP2 und AG1478 gelöst sind, wurden die Zellen mit den entsprechenden Mengen an DMSO behandelt und anschließend mit EGF

stimuliert. Es konnte festgestellt werden, dass DMSO keinen Einfluss auf die oben genannten EGF-induzierten Signalwege hat. Daher sind die in Abb. 37A dargestellten Ergebnisse allein auf die Wirkung der Inhibitoren zurückzuführen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass EGFR- vermittelte Signalwege von Src- Kinasen abhängig sind.

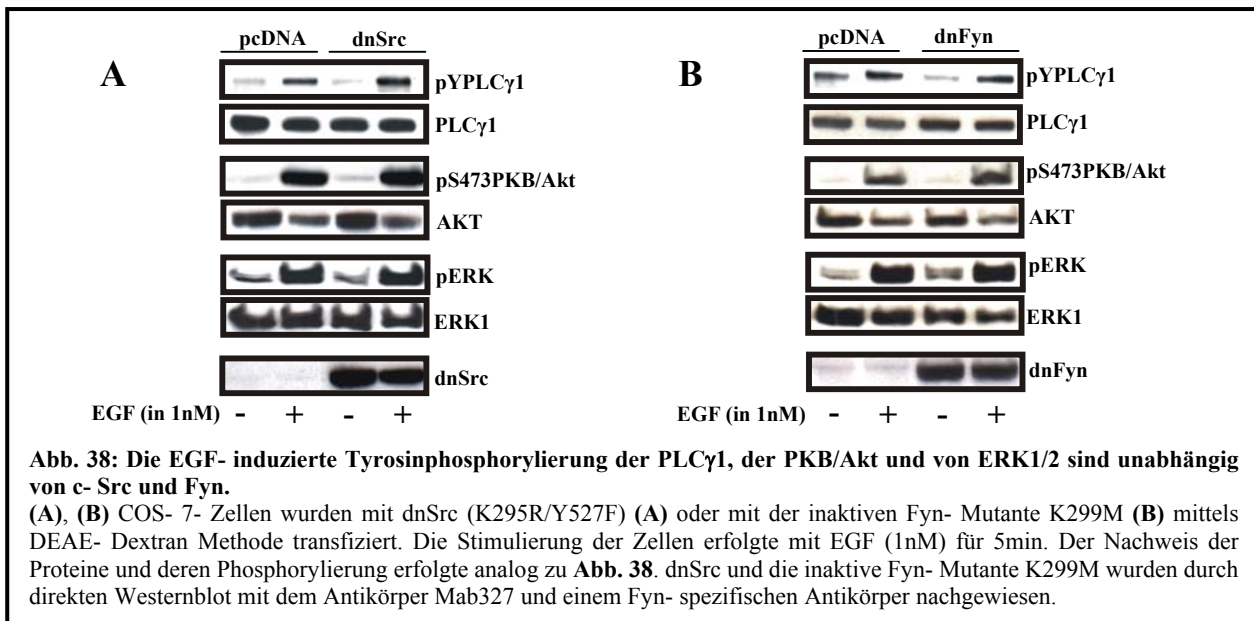


**Abb. 37: EGF- und HB- EGF- induzierte Signalwege sind PP2- sensitiv.**

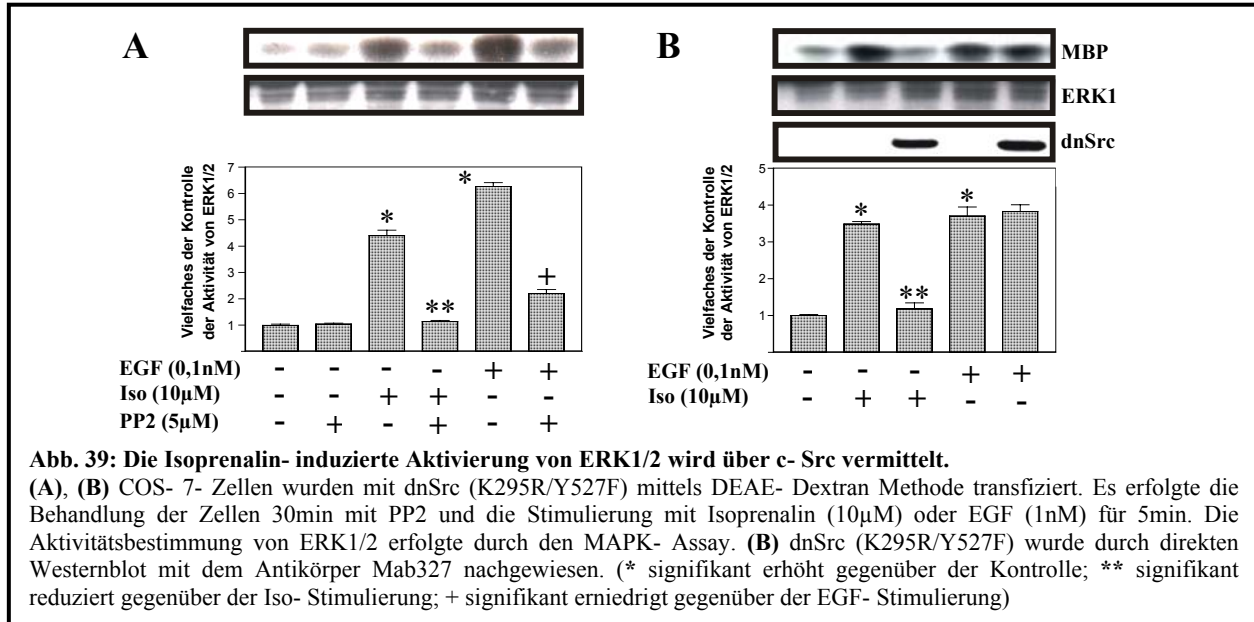
COS- 7- Zellen wurden 30min mit PP2 (10μM), AG1478 (0,5μM) (**A**) oder mit DMSO (**B**) inkubiert und anschließend mit EGF (1nM) (**A**), (**B**) für 5min stimuliert. Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLCγ1 erfolgte durch die Immunopräzipitation mit dem Antikörper Mab425 (für den EGFR) und einem PLCγ1- spezifischen Antikörper. Daran schloss sich die SDS- PAGE (10%) mit anschließendem Westernblot an. Der Nachweis der Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLCγ1 erfolgte mit 4G10. Der Reblot erfolgte mit dem Antikörper 13G8 (für den EGFR) und mit einem PLCγ1- spezifischen Antikörper. Der Nachweis von pY845, pERK und von pS473 der PKB/Akt erfolgte durch SDS- PAGE und anschließenden Westernblot. Die verwendeten Antikörper waren 12A3 (für pY845), 3A7 (für pERK) und pS473 PKB/Akt. Die Reblots wurden mit 13G8 (für den EGFR), C- 16 (für ERK1/2) und einem PKB/Akt- spezifischen Antikörper durchgeführt. Diese Bilder stehen für zwei voneinander unabhängige Experimente.

Es ist bekannt, dass die durch PP2 hervorgerufenen Effekte in den meisten Fällen mittels Überexpression von dn- c- Src Mutanten reproduzierbar sind. Dieser Zusammenhang sollte auch für die hier betrachteten EGF- induzierten Signalwege untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit der dominant- negativen Mutante dnSrc (K295R/Y527F) transfiziert und anschließend mit EGF stimuliert. Da PP2 auf die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR keinen Einfluss zeigte, wurde die Wirkung der inaktiven Src- Mutanten auf diesen Signalweg nicht näher untersucht.

Wie sich zeigte, hat jedoch die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) weder einen Einfluss auf die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLCγ1, die Phosphorylierung von S473 der PKB/Akt noch auf die Aktivierung von ERK1/2 (Abb. 38A). Da COS- 7- Zellen neben c- Src auch Fyn exprimieren, wurde vermutet, dass die PP2- Effekte weniger durch die Inhibierung von c- Src, sondern vielmehr durch die Inhibierung von Fyn zustande kommen. Aus diesem Grund wurde die inaktive Fyn- Mutante K299M in COS- 7- Zellen überexprimiert. Wie sich allerdings zeigte, hat auch die Transfektion der Zellen mit der inaktiven Fyn- Mutante K299M keinen signifikanten Einfluss auf diese Signalwege (Abb. 38B).

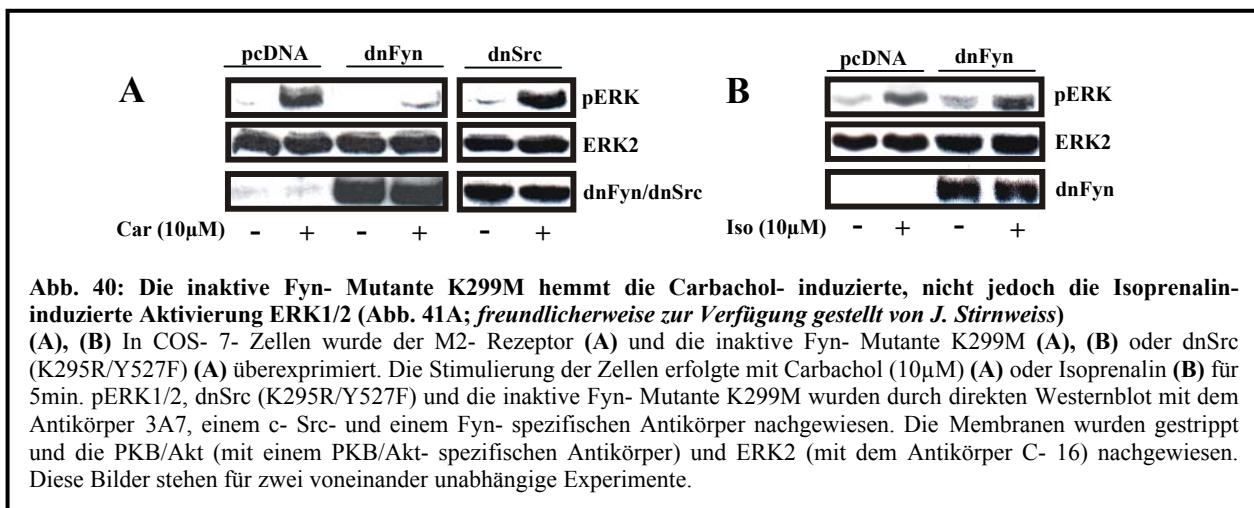


Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Literaturdaten und den mit PP2 erhaltenen Resultaten. Daher sollte geklärt werden, ob eine solche Diskrepanz auch bei GPCR- vermittelten Signalwegen besteht. Da bekannt ist, dass die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 über c- Src vermittelt wird (Maudsley et al., 2000), sollte der Einfluss von dnSrc (K295R/Y527F) und die Wirkung von PP2 auf diesen Signalweg untersucht werden. Als Vergleich ist die Wirkung von PP2 und dnSrc (K295R/Y527F) auf die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 aufgeführt.



Wie Abb. 39 zeigt, wurde die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 sowohl durch PP2 als auch durch die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) blockiert. Die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 konnte hingegen nur durch die Verwendung von PP2 vollständig gehemmt werden. Die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) zeigte keinen Einfluß. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die Wirkung von PP2 und dnSrc (K295R/Y527F) nur bei der Isoprenalin- induzierten Aktivierung von ERK1/2 vergleichbar ist.

Da die inaktive Fyn- Mutante K299M keinen Einfluss auf EGF- induzierte Signalwege hat, sollte auch deren Wirkung auf die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 untersucht werden. Dabei diene die Carbachol- induzierte Aktivierung von ERK1/2 in COS- 7- Zellen mit transient transfiziertem M2- Rezeptor als Positivkontrolle. Dazu wurde dnSrc (K295R/Y527F) oder die inaktiven Fyn- Mutante K299M überexprimiert und die Zellen mit Isoprenalin oder Carbachol (Zellen mit transient transfiziertem M2- Rezeptor) stimuliert. Wie Abb. 40A zeigt, hatte die Überexpression der inaktiven Fyn- Mutante K299M eine Hemmung der Carbachol- induzierten Aktivierung von ERK1/2 zur Folge (Abb. 40A, zur Verfügung gestellt von J. Stirnweiss). Dabei stimmt auch in diesem Fall die Hemmwirkung von PP2 mit der Überexpression der inaktiven Fyn- Mutante K299M überein (Dissertation J. Stirnweiss). Wurde hingegen dnSrc (K295R/Y527F) überexprimiert, hatte dies keinen Einfluss auf die Carbachol- induzierte Aktivierung von ERK1/2 (Abb. 40A). Die Überexpression der inaktiven Fyn- Mutante K299M zeigte im Gegensatz dazu keinen Wirkung auf die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 (Abb. 40B).



Durch diese Experimente wird deutlich, dass beide Src- Mutanten nur ganz spezifisch bestimmte Signalwege blockieren können und die fehlende Hemmung der EGF- induzierten Signalwege nicht auf die Unwirksamkeit dieser Src- Mutanten zurückzuführen ist. Aus diesem Grund kann die Schlussfolgerung getroffen werden, dass die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 spezifisch nur durch c- Src und die Carbachol- induzierte Aktivierung von ERK1/2 spezifisch nur durch Fyn vermittelt werden (Dissertation J. Stirnweiss). Die EGF- induzierten Signalwege, wie die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1, die Phosphorylierung von S473 der PKB/Akt und die Aktivierung von ERK1/2, scheinen hingegen in COS- 7 unabhängig von c- Src und Fyn vermittelt zu werden. Des weiteren konnte nur bei der  $\beta_2$ - und M2- Rezeptor- vermittelten Aktivierung von ERK1/2 eine Übereinstimmung der Wirkung von PP2 und den überexprimierten Src- Mutanten gefunden werden. Daher kann angenommen werden, dass die Wirkung von PP2 bei der Isoprenalin- und Carbachol- (Dissertation J. Stirnweiss) induzierten Aktivierung von ERK1/2 auf die Hemmung von c- Src bzw. von Fyn zurückzuführen ist. Dies macht deutlich, dass PP2 ein spezifischer Src- Kinaseinhibitor ist. Der Widerspruch, der durch die Verwendung von PP2 und den Src- Mutanten bei

den EGF- induzierten Signalwegen zustande kommt, kann jedoch nicht erklärt werden. Da COS- 7- Zellen allerdings neben c- Src und Fyn noch weitere Src- Kinasen, wie z.B. Yes exprimieren, kann nicht ausgeschlossen werden kann, dass durch die Verwendung von PP2 diese oder ähnliche Kinasen gehemmt werden.

Um zu bestätigen, dass c- Src nicht an der Vermittlung der EGF- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1, der Phosphorylierung von S473 der PKB/Akt und an der Aktivierung von ERK1/2 beteiligt ist, wurden SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen verwendet. Durch diese Zelllinien kann die Rolle von Src- Kinasen bei verschiedenen Signalwegen ohne Verwendung pharmakologischer Inhibitoren und ohne Transfektion inaktiver Src- Mutanten aufgeklärt werden. Dabei wurde von folgenden Vermutungen ausgegangen:

Findet eine Aktivierung dieser Signalwege statt, so kann geschlussfolgert werden, dass die Vermittlung dieser Signalwege nicht essentiell an die Aktivierung von Src- Kinasen gebunden ist. Wäre, wie in einigen Veröffentlichungen beschrieben, c- Src an der Vermittlung dieser Signalwege beteiligt, so müsste dies eine verstärkte Aktivierung dieser Signalwege in SYF<sup>+</sup>- Zellen im Gegensatz SYF- Zellen zur Folge haben.

Wie sich herausstellte, findet die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der PLC $\gamma$ 1, die Phosphorylierung von S473 der PKB/Akt sowie die Aktivierung von ERK1/2 in SYF- und in SYF<sup>+</sup>- Zellen in gleichem Ausmaß statt (Abb. 41).

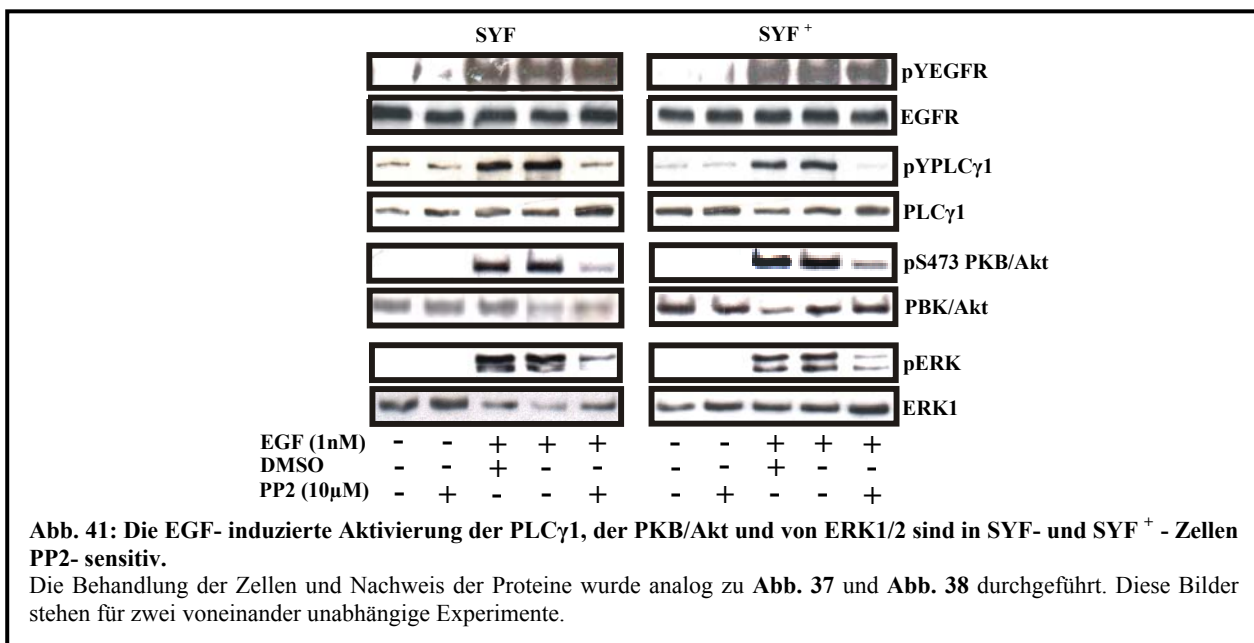
Dies bestätigt die anfängliche Vermutung und schließt die Beteiligung von c- Src bei der Vermittlung der genannten EGF- induzierten Signalwege in diesen Zellen und unter diesen Bedingungen aus. Die Beteiligung von Fyn und Yes kann hingegen nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da für solche Untersuchungen Zelllinien nötig wären, die im Vergleich zu SYF- Zellen entweder Fyn oder Yes exprimieren. Daher kann lediglich geschlussfolgert werden, dass die Vermittlung dieser Signalwege, wie in SYF und SYF<sup>+</sup>- Zellen (beide Zelllinien sind Fyn- und Yes- defizient), auch ohne Fyn und Yes möglich ist.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde angenommen, dass die durch PP2 hervorgerufene Hemmbarkeit der EGF- induzierten Signalwege in COS- 7- Zellen möglicherweise nicht nur auf die Inhibierung der Src- Kinasen zurückzuführen ist. Um diese Annahme zu bestätigen, sollte untersucht werden, ob PP2 auch in SYF- Zellen die Hemmung dieser EGF- induzierten Signalwege verursacht. Dabei würde eine nachweisbare Hemmung in SYF- Zellen bedeuten, dass PP2 nicht spezifisch nur Src- Kinasen, sondern darüber hinaus möglicherweise auch andere Proteine in ihrer Aktivität beeinflussen kann, die bei EGF- induzierten Signalwegen eine wichtige Rolle spielen. Im Vergleich dazu wurde dasselbe Experiment in SYF<sup>+</sup>- Zellen durchgeführt. Überraschenderweise konnte auch in Src- defizienten SYF- Zellen durch PP2 eine deutliche Hemmung der EGF- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1, der Phosphorylierung von S473 der PKB/Akt sowie der Aktivierung von ERK1/2 hervorgerufen werden (Abb. 41). Dabei ist die Hemmwirkung in SYF- und



SYF<sup>+</sup>- Zellen gleich stark ausgeprägt und konnte, wie in COS- 7- Zellen, erst durch eine PP2-Konzentration von 10µM erreicht werden (Konzentrationsreihe nicht gezeigt). Die Wirkung von PP2 kann dabei nicht auf einen Lösungsmittelleffekt zurückgeführt werden, da DMSO im selben Experiment keinen Einfluss zeigte. Die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR bleibt dagegen auch in Gegenwart von PP2 in beiden Zelllinien unverändert. Die durch PP2 hervorgerufene Hemmung der EGF- induzierten Signalwege in SYF<sup>+</sup>- Zellen könnte auf die Inhibierung von c- Src zurückgeführt werden, da diese Zellen c- Src exprimieren. Da jedoch im Vergleich dazu die PP2-induzierte Hemmung dieser Signalwege in SYF- Zellen im gleichem Ausmaß stattfindet, kann auch der inhibitorische Effekt in SYF<sup>+</sup>- Zellen auf die Inhibierung anderer Tyrosinkinase zurückgeführt werden (Sorkina et al., 2002).

Dagegen kann die PP2- vermittelte Hemmung der Isoprenalin- induzierten Aktivierung von ERK1/2 in SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen direkt auf die Inhibierung von c- Src zurückgeführt werden. PP2 zeigte nur in SYF<sup>+</sup>- Zellen, nicht aber in SYF- Zellen eine vollständige Hemmung der Isoprenalin- induzierten Aktivierung von ERK1/2 (siehe Kapitel 4.1.2, Abb. 10). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass c- Src spezifisch die Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 vermittelt. EGF- induzierte Signalwege scheinen hingegen unabhängig von c- Src vermittelt zu werden.



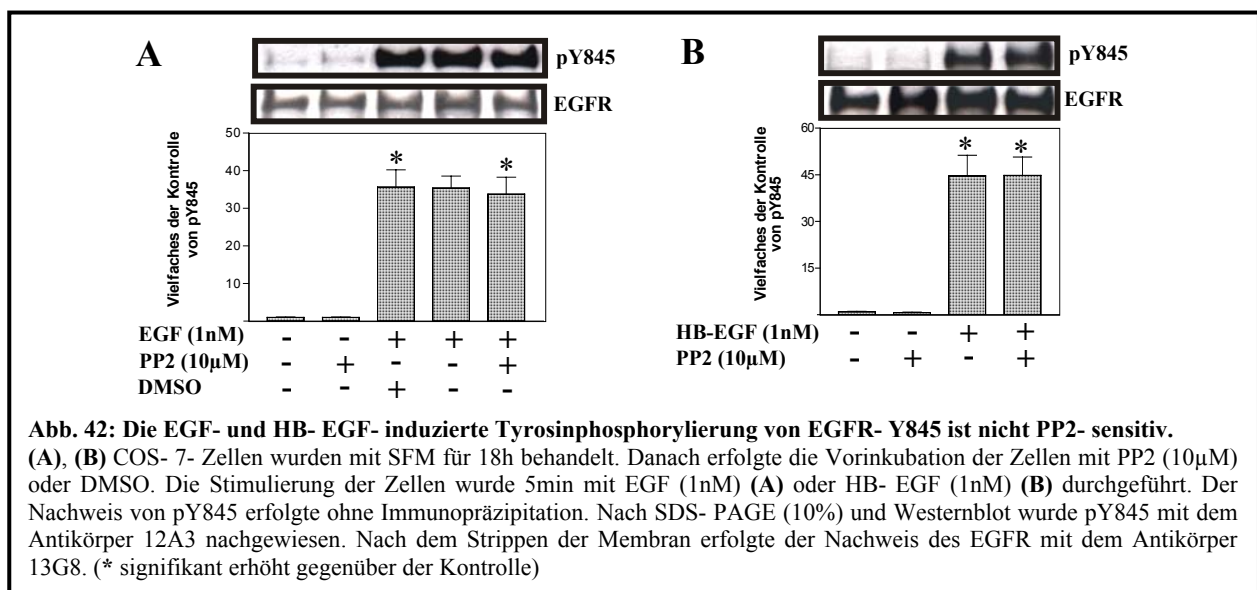
Somit kann auch geschlussfolgert werden, dass c- Src und Fyn hochspezifisch nur für die Vermittlung ganz bestimmter Signalwege in COS- 7- Zellen aktiviert werden. Für EGF- induzierte mitogene Signalwege scheinen hingegen in COS- 7- Zellen unter diesen zellulären Bedingungen c- Src und Fyn nicht notwendig zu sein. Die Wirkung von PP2 in COS- 7- und SYF- Zellen ist nicht restlos erklärbar, könnte jedoch mit der Hemmung einer weiteren Src- Isoform zusammenhängen, die an der Vermittlung dieser Signalwege beteiligt ist (Sorkina et al., 2002). Aus diesem Grund kann die Hemmwirkung von PP2 auf bestimmte Signalwege nicht generell auf die Hemmung von c- Src, Yes oder Fyn zurückgeführt werden.



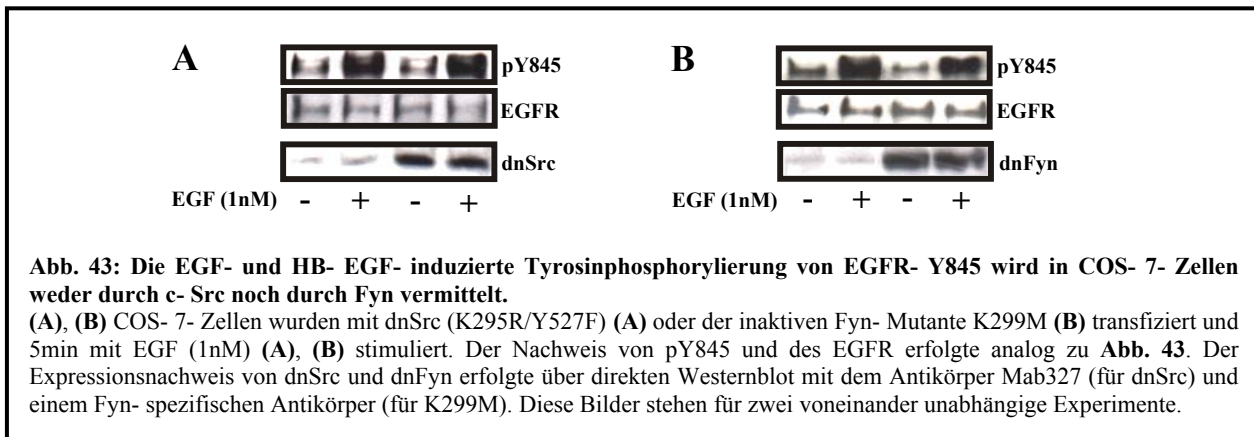
#### 4.5. Die c-Src-abhängige Phosphorylierung von EGFR-Y845 ist vom Expressions-level von c-Src und des EGFR abhängig

In den vorangegangenen Abschnitten konnte nachgewiesen werden, dass die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 sowie die Phosphorylierung der PKB/Akt und von ERK1/2 in COS-7- und SYF-Zellen möglicherweise unabhängig von c-Src vermittelt werden. Des Weiteren konnte bestätigt werden, dass PP2 nicht nur die üblichen Src-Kinasen, sondern darüber hinaus weitere, für EGF-induzierte Signalwege wichtige Tyrosinkinasen zu hemmen scheint (Sorkina et al., 2002). In diesem Abschnitt sollte die EGF-induzierte und die c-Src-vermittelte Phosphorylierung von EGFR-Y845 untersucht werden (Biscardi et al., 1999a; Tice et al., 1999; Sato et al., 2003). Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden verschiedene experimentelle Ansätze gewählt. Dazu gehört die Behandlung der Zellen mit PP2, die Überexpression inaktiver Src-Mutanten und die Verwendung von SYF- und SYF<sup>+</sup>-Zellen. Da EGFR-Y845 als c-Src-spezifischer Tyrosinrest definiert ist, sollte auch an dieser Stelle die Spezifität von PP2 untersucht werden.

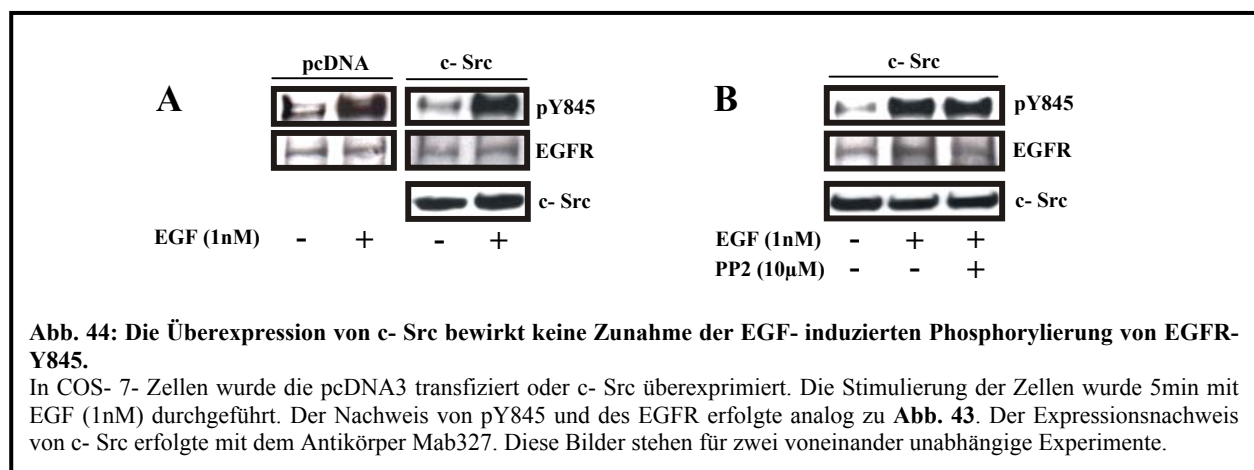
COS-7-Zellen wurden mit PP2 vorbehandelt und mit EGF und HB-EGF stimuliert. Wie Abb. 42A und 42B zeigt, hatte PP2 keinen hemmenden Effekt auf die EGF- oder HB-EGF-induzierte Phosphorylierung von EGFR-Y845. Diese Ergebnisse deuten zunächst darauf hin, dass Src-Kinasen unter diesen zellulären Bedingungen nicht an der Phosphorylierung von EGFR-Y845 beteiligt sind.



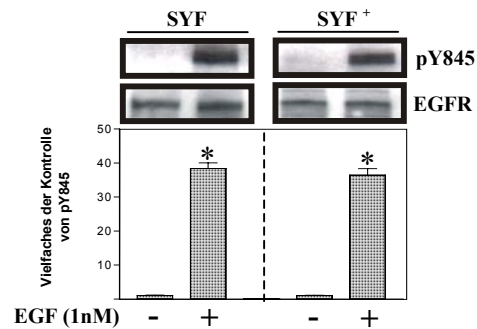
Als nächstes wurde die Wirkung von dnSrc (K295R/Y527F) und der inaktiven Fyn-Mutante K299M auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von EGFR-Y845 untersucht. Wie Abb. 43A und 43B zeigt, hatte auch die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) und der inaktiven Fyn-Mutante K299M keinen Einfluss auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von EGFR-Y845.



Da dnSrc (K295R/Y527F) keine Wirkung auf die EGF-induzierte Phosphorylierung von EGFR-Y845 hatte, sollte untersucht werden, wie sich die Überexpression von c-Src auf die Phosphorylierung von EGFR-Y845 auswirkt. Es wurde davon ausgegangen, dass erst die Überexpression von c-Src eine EGF-induzierte und c-Src-vermittelte Phosphorylierung von EGFR-Y845 zur Folge hat. Dazu wurde c-Src in COS-7-Zellen überexprimiert, die Zellen mit PP2 vorinkubiert und anschließend mit EGF stimuliert. Wie jedoch in **Abb. 44** zu sehen ist, führte die Überexpression von c-Src weder zu einer Zunahme noch zu einer PP2-sensitiven EGF-induzierten Phosphorylierung von EGFR-Y845.



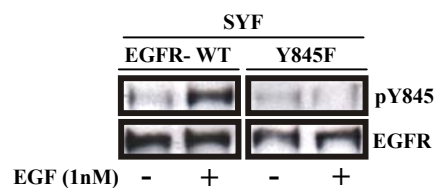
Da Experimente mit pharmakologischen Inhibitoren oder die Überexpression inaktiver oder dominant-negativer Proteine zu Fehlinterpretationen führen können (Andreev et al., 2001), sollte die EGF-induzierte Phosphorylierung von EGFR-Y845 in SYF<sup>-</sup> und SYF<sup>+</sup>-Zellen untersucht werden. Diese Ergebnisse sind in **Abb. 45** dargestellt und zeigen, dass EGF die Phosphorylierung von EGFR-Y845 auch in Zellen induzieren kann, die, wie SYF<sup>-</sup>-Zellen, keine Src-Kinasen exprimieren. Hinzu kommt, dass die Stärke der Phosphorylierung von EGFR-Y845 in SYF<sup>-</sup> und SYF<sup>+</sup>-Zellen keinen signifikanten Unterschied aufweist. Diese Experimente belegen, dass c-Src nicht an der Phosphorylierung von EGFR-Y845 beteiligt sein muss und daher auch nicht als genereller Vermittler dieser Phosphorylierung angesehen werden kann.



**Abb. 45: EGF induziert die Phosphorylierung von EGFR- Y845 in SYF- Zellen.**

SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen wurden 5min mit EGF stimuliert. Der Nachweis von pY845 erfolgte ohne Immunopräzipitation. Nach SDS- PAGE (10%) und Westernblot wurde EGFR- Y845 mit dem Antikörper 12A3 nachgewiesen. Nach Strippen der Membran wurde der EGFR mit 13G8 nachgewiesen. Diese Bilder stehen für zwei Experimente. (\* signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle)

Bei der Verwendung von site- spezifischen Antikörpern kann eine unspezifische Wechselwirkung mit anderen phosphorylierten Tyrosinresten nie ganz ausgeschlossen werden. Daher sollte die Spezifität des pY845- spezifischen Antikörpers 12A3 überprüft werden. Aus diesem Grund wurde der EGFR- WT oder EGFR- Y845F in SYF- Zellen überexprimiert und die Zellen mit EGF stimuliert. Es konnte festgestellt werden, dass der Antikörper 12A3 nur den phosphorylierten EGFR- WT erkennt (Abb. 46). EGFR- Y845F hingegen wurde von 12A3 nicht erkannt. Wie in Abb. 46 weiterhin gezeigt wird, war in EGFR- Y845F- überexprimierenden SYF- Zellen auch die Phosphorylierung von EGFR- Y845 des endogenen EGFR nicht nachweisbar. Der Grund dafür könnte sein, dass die Konzentration des endogenen EGFR im Vergleich zum überexprimierten EGFR so gering ist, dass durch die kurzen Belichtungszeiten der Röntgenfilme, die durch das sehr starke Signal des überexprimierten EGFR bedingt sind, für den Nachweis der Phosphorylierung von EGFR- Y845 des endogenen EGFR nicht ausreichend waren.



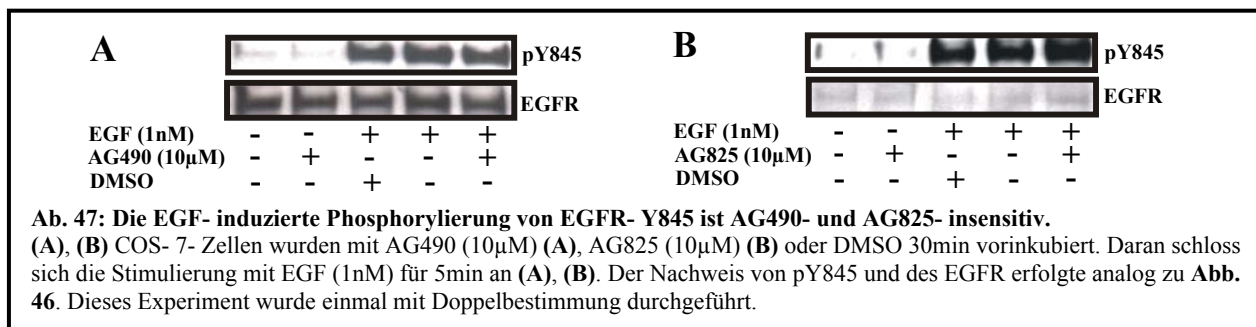
**Abb. 46: Der Antikörper 12A3 erkennt nur den EGFR- WT, nicht jedoch den EGFR- Y845F.**

In SYF- Zellen wurden mittels Lipofectamin- Methode der EGFR- WT oder EGFR- Y845F überexprimiert. Es folgte die Stimulierung mit EGF (1nM) für 5min. Der Nachweis von pY845 und des EGFR erfolgte analog zu Abb. 45. Diese Bilder stehen für zwei Experimente.

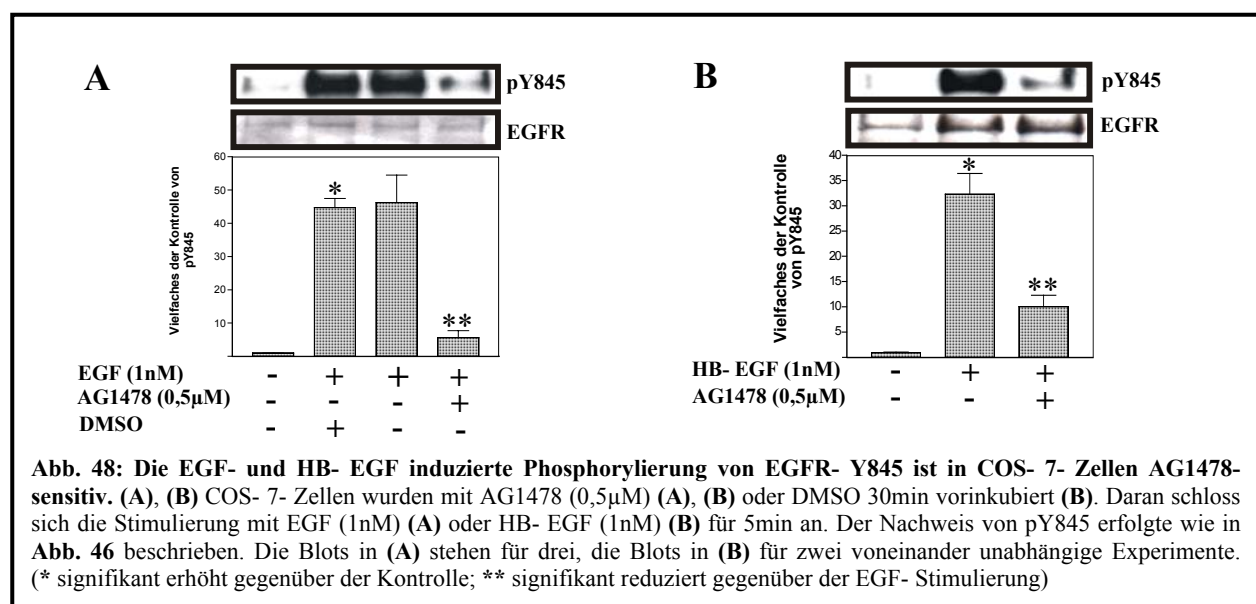
Da Src- Kinasen bei der EGF- induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845 in diesen Zellen und unter diesen zellulären Bedingungen ausgeschlossen werden konnten, sollte untersucht werden, durch welche Kinase diese Phosphorylierung vermittelt wird. Aus diesem Grund wurden verschiedene Inhibitoren eingesetzt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass EGFR- Y845 in Zellen mit überexprimiertem EGFR und überexprimierter c- Src an der STAT- abhängigen DNA- Synthese beteiligt ist (Kloth et al., 2003; Xi et al., 2003). Des weiteren ist bekannt, dass Jak2 an der Regulation verschiedener Rezeptor- tyrosinkinasen beteiligt sein kann (Schindler et al., 1995; Leaman et al., 1996). Daher sollte der

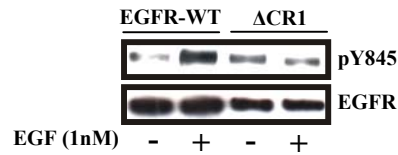
Einfluss von JAK- Kinasen auf die Phosphorylierung von EGFR- Y845 unter diesen zellulären Bedingungen untersucht werden. Dazu wurde der JAK- Kinase- spezifische Inhibitor AG490 verwendet (Xi et al., 2003). Es wurde festgestellt, dass AG490 keine Wirkung auf die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 hatte (Abb. 47A). Da COS- 7- Zellen neben ErbB1 auch ErbB2 exprimieren (Schaefer et al., 1999), könnte die Phosphorylierung von EGFR- Y845 auch über einen transmodulatorischen Prozess durch ErbB2 vermittelt werden. Um diese Möglichkeit näher zu untersuchen, wurde der ErbB2- spezifische Inhibitor AG825 genutzt (Osherov et al., 1993; Levitzki et al., 1995) und die Zellen anschließend mit EGF stimuliert. Auch dieser Inhibitor zeigte keinen Einfluss auf die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 (Abb. 47B).



Da durch die Verwendung der verschiedenen Tyrosinkinase- Inhibitoren eine Reihe von Tyrosinkinasen als Vermittler der Phosphorylierung von EGFR- Y845 ausgeschlossen werden konnte, wurde überprüft, inwieweit der EGFR selbst in die Phosphorylierung von EGFR- Y845 involviert ist. Dazu wurden COS- 7- Zellen mit AG1478 behandelt und mit EGF stimuliert. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass in COS- 7- Zellen die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 vollständig durch AG1478 gehemmt werden kann (Abb. 48A). Parallel dazu wurde dasselbe Experiment mit HB- EGF durchgeführt. Wie Abb. 48B zeigt, wurde auch die HB- EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 durch AG1478 vollständig gehemmt.



Um einen weiteren Hinweis auf den Mechanismus der EGF- induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845 zu erhalten, wurde in COS- 7- Zellen der EGFR-  $\Delta$ CR1 überexprimiert. Wie Abb. 49 zeigt, hemmte die Überexpression dieser Mutante die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845.

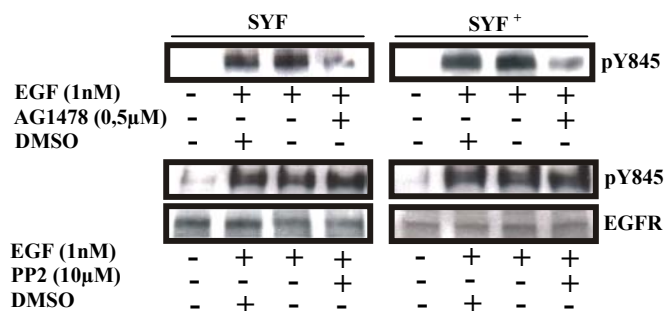


**Abb. 49: Die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 ist von der Dimerisierung des EGFR abhängig.**

In COS- 7- Zellen wurde der EGFR-  $\Delta$ CR1 mittels DEAE- Dextran überexprimiert. Daran schloss sich die Stimulierung mit EGF (1nM) für 5min an. Der Nachweis von pY845 erfolgte analog zu **Abb. 46**. Diese Bild steht für zwei voneinander unabhängige Experimente.

Daraus kann geschlussfolgert werden, dass neben der Tyrosinkinaseaktivität auch die EGF- induzierte Dimerisierung für die Phosphorylierung von EGFR- Y845 eine wichtige Rolle spielt. Anschließend sollte die Wirkung von AG1478 auf die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 in SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen untersucht werden. Wie sich zeigte, kann auch in diesen Zelllinien die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 durch die Vorinkubation mit AG1478 gehemmt werden (Abb. 50). Andere Inhibitoren, wie der ErbB2- spezifische Inhibitor AG825, zeigten in diesen Zellen keinen Einfluss auf die EGF- induzierte Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes (Ergebnis nicht gezeigt). In einem Kontrollexperiment wurde untersucht, ob PP2 in SYF- oder SYF<sup>+</sup>- Zellen die Phosphorylierung von EGFR- Y845 unterdrücken kann.

Wie in Abb. 50 gezeigt wird, hatte die Vorinkubation dieser Zellen mit PP2 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von EGFR- Y845. Damit kann c- Src als Vermittler bei der Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes ausgeschlossen werden.



**Abb. 50: Die EGF- und HB- EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 ist in SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen AG1478- sensitiv.**

SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen wurden mit PP2 (10μM), AG1478 (0,5μM) oder DMSO 30min vorinkubiert. Daran schloss sich die Stimulierung mit EGF (1nM) für 5min an. Der Nachweis von pY845 erfolgte wie in **Abb. 46** beschrieben. Dieses Kontrollexperiment wurde einmal mit einer 4-fach Bestimmung in beiden Zelllinien durchgeführt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 unter diesen zellulären Bedingungen weder durch die cytosolischen Tyrosinkinasen c- Src, Fyn, Yes oder Jak2, noch durch die Rezeptortyrosinkinase ErbB2 vermittelt wird. Vielmehr scheint unter diesen Bedingungen die Phosphorylierung von EGFR- Y845 über den EGFR vermittelt zu werden.

Es ist jedoch unklar, ob der EGFR selbst diese Phosphorylierung vermitteln kann, oder ob eine bisher noch unbekannte cytosolische Tyrosinkinase zwischengeschaltet ist.

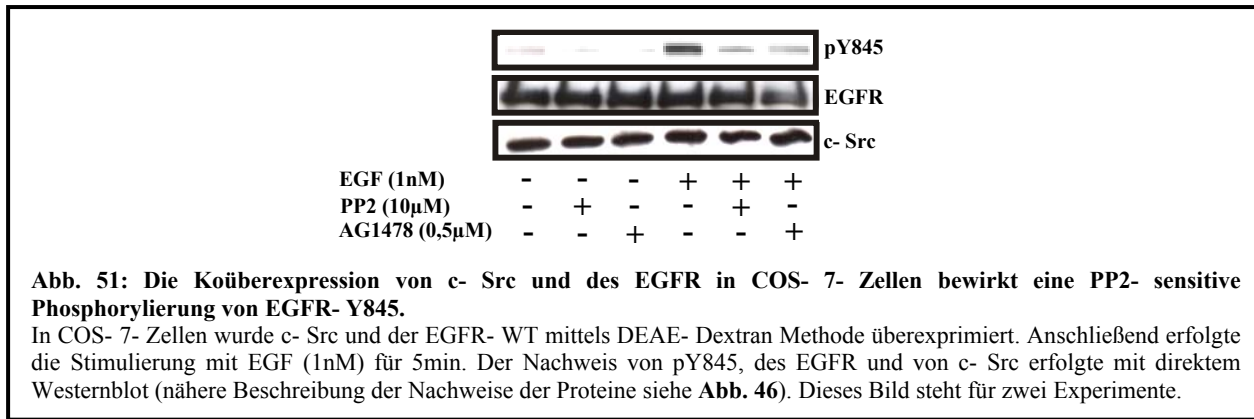
#### 4.5.1. Auswirkungen der Überexpression des EGFR und von c-Src auf die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845

Anhand der oben genannten Ergebnisse ist die Rolle von c- Src in COS- 7- und SYF<sup>+</sup>- Zellen unter endogenen Bedingungen bei den hier untersuchten EGF- induzierten Signalwegen fraglich. Durch eine Reihe von Arbeiten konnte jedoch die essentielle Funktion von c- Src bei EGF- induzierten Signalwegen in vielen Zelllinien gut belegt werden. Dies betrifft insbesondere die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 (Haskell et al., 2001).

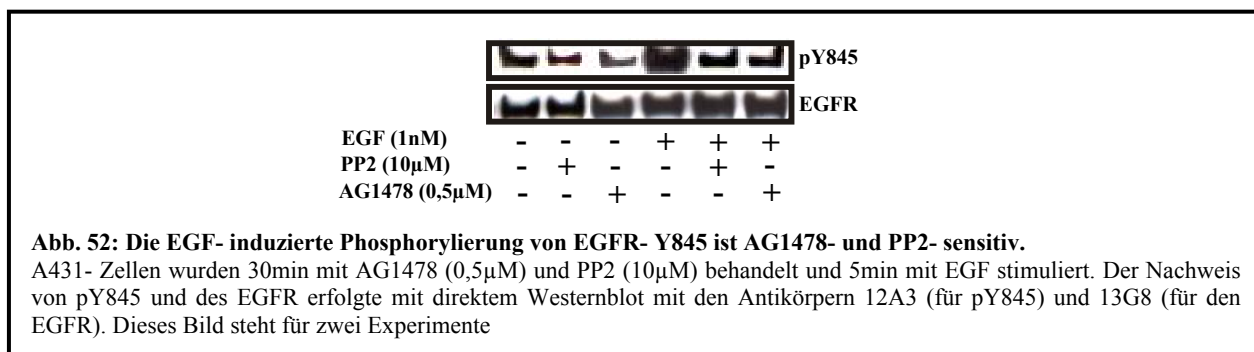
Interessant ist, dass eine c- Src- Abhängigkeit der verschiedenen EGF- induzierten Signalwege nur dann aufzutreten scheint, wenn, wie in verschiedenen Tumorzellen, entweder der EGFR oder c- Src oder beide Proteine überexprimiert vorliegen. Die hier verwendeten Zellen (COS- 7- und SYF- Zellen) zeigen hingegen keine Überexpression des EGFR und/oder von c- Src. Aus diesem Grund sollte mit COS- 7- Zellen untersucht werden, ob durch die Überexpression des EGFR und/oder von c- Src eine Abhängigkeit der EGF- induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845 von c- Src entsteht. Hierfür wurde PP2 verwendet. Dabei wurde in COS- 7- Zellen gezeigt, dass weder durch die alleinige Überexpression von c- Src noch des EGFR eine PP2- Sensitivität der EGF- induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845 hervorgerufen werden kann (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Hemmung der Phosphorylierung von EGFR- Y845 durch AG1478 konnte hingegen auch unter diesen zellulären Bedingungen nachgewiesen werden (Resultate nicht gezeigt).

Als nächstes wurden der EGFR und c- Src in COS- 7- Zellen koüberexprimiert und die Zellen mit PP2 und AG1478 vorinkubiert und anschließend mit EGF stimuliert. Wie Abb. 51 zeigt, führte die Vorinkubation mit PP2 und AG1478 zu einer vollständigen Hemmung der EGF- induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass in COS- 7- Zellen nur dann eine PP2- sensitive Hemmung der EGF- induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845 erreicht werden kann, wenn der EGFR und c- Src gleichzeitig überexprimiert vorliegen. Da jedoch im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, dass vermutlich die Wirkung von PP2 auf EGF- induzierte Signalwege, wie die Aktivierung PLC $\gamma$ 1, der PKB/Akt und von ERK1/2, weniger auf die Hemmung von Src- Kinasen, als auf die Hemmung anderer Proteine zurückgeführt werden kann, ist auch in diesem Fall eine derartige Wirkung von PP2 nicht auszuschließen.

Im Unterschied dazu tritt jedoch die inhibitorische Wirkung von PP2 auf die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 nur dann auf, wenn c- Src und der EGFR überexprimiert vorliegen (Abb. 51). Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung von PP2 unter diesen Bedingungen, tatsächlich auf die Hemmung der überexprimierten c- Src zurückgeführt werden kann.



A431- Zellen überexprimieren endogen sowohl den EGFR als auch c- Src. Die Beteiligung von c- Src an der EGF- induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845 in diesen Zellen konnte bereits durch die Überexpression von dnSrc und PP2 nachgewiesen werden (Sato et al., 2003). Daher wurde die durch PP2- hervorgerufene Hemmung der EGF- induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845 unter endogenen Bedingungen in A431- Zellen als Positivkontrolle aufgeführt und mit den Ergebnissen aus Abb. 51 verglichen. Dazu wurden die Zellen mit AG1478 und PP2 behandelt. Durch die Behandlung der Zellen mit diesen Inhibitoren konnte die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 gehemmt werden (Abb. 52).



Weiterhin ist in den Abb. 51 und 52 zu sehen, dass durch die Vorinkubation der Zellen mit AG1478 und PP2 auch die basale Phosphorylierung von EGFR- Y845 gehemmt wird. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass die basale- und die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 nur dann c- Src abhängig ist, wenn der EGFR und c- Src gleichzeitig überexprimiert vorliegen.

#### 4.5.2. Die EGF- vermittelte Phosphorylierung von EGFR- Y845 in anderen Zelllinien

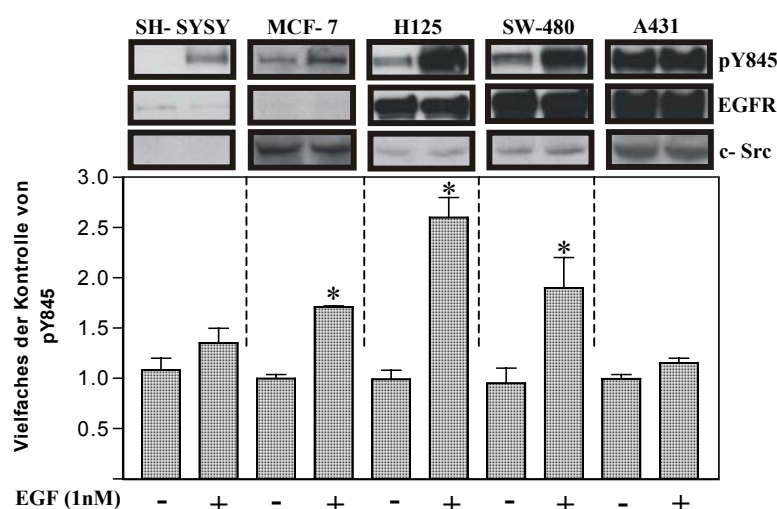
Es wurde angenommen, dass die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 maßgeblich davon abhängt, in welchem Ausmaß c- Src und der EGFR überexprimiert werden. Daher sollte in verschiedenen Zelllinien das Expressionsmuster von c- Src und des EGFR sowie der daraus resultierende Phosphorylierungsgrad von EGFR- Y845 miteinander verglichen werden (Abb. 53). Dabei konnte festgestellt werden, dass durch die gleichzeitige Überexpression des EGFR und von c- Src eine Potenzierung der basalen Phosphorylierung von EGFR- Y845 hervorgerufen wird. Wird hingegen nur der EGFR oder nur c- Src überexprimiert, so hat dies eine relativ schwache Zunahme der



basalen Phosphorylierung von EGFR- Y845 zur Folge. So wurde, im Vergleich zu H125- und SW- 480- Zellen (die nur den EGFR überexprimieren) und MCF- 7- Zellen (die nur c- Src überexprimieren), in A431- Zellen (die c- Src und den EGFR überexprimieren) die höchste basale Phosphorylierung von EGFR- Y845 erreicht (Abb. 53 und Abb. 54). Dies wird besonders durch den direkten Vergleich von SW480- und A431- Zellen deutlich. Beide Zelllinien exprimieren den EGFR ungefähr gleich stark, c- Src wird jedoch nur von A431- Zellen zusätzlich überexprimiert. Dieser Unterschied scheint sich auf die basale Phosphorylierung von EGFR- Y845 auszuwirken. Wie Abb. 53 und Abb. 54 zeigen, kommt es nur in A431- Zellen zu einem sehr starken Anstieg der basalen Phosphorylierung von EGFR- Y845.

Werden, wie in A431- Zellen, beide Proteine überexprimiert, so ist nur mit relativ hohen EGF- Konzentrationen zusätzlich eine leichte EGF- stimulierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 nachweisbar. Findet jedoch nur die Überexpression eines der beiden Proteine statt, so konnte eine deutliche EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845, wie in MCF- 7, H125- und SW- 480- Zellen, nachgewiesen werden (Abb. 53 und Abb. 54). Das bedeutet, dass die relative Zunahme der Phosphorylierung von EGFR- Y845 durch die Überexpression des EGFR und von c- Src abnimmt (Abb. 53 und Abb. 54). Weiterhin wurde durch die Verwendung von SH- SYSY- Zellen das Ergebnis mit SYF- Zellen bestätigt und gezeigt, dass auch in Zellen, die c- Src nicht exprimieren, die Phosphorylierung von EGFR- Y845 vermittelt werden kann (Abb. 53).

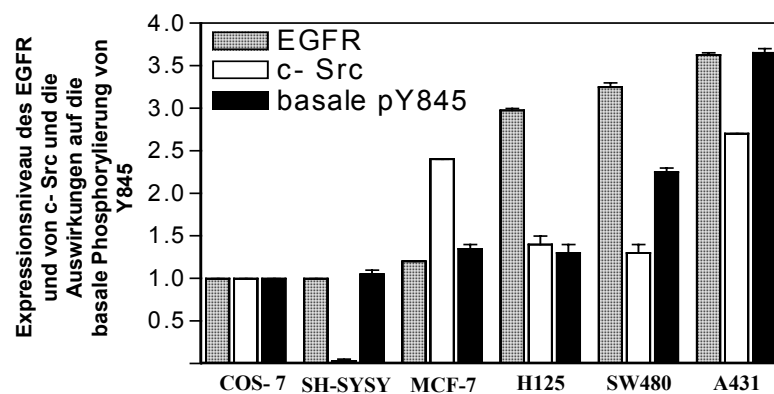
Aus diesem Grund kann geschlussfolgert werden, dass die basale und die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 nur dann c- Src- abhängig zu erfolgen scheint, wenn der EGFR und c- Src koüberexprimiert vorliegen. Dieses Ergebnis bestätigt, dass durch die Vorinkubation EGFR- und c- Src- überexprimierender Zellen mit PP2 und AG1478 die basale- und EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 hemmbar ist (Abb. 51, 52)



**Abb. 53: Die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 in anderen Zelllinien.**

Es wurden 1,5Mio. Zellen/100mm Platte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen mit SFM für 18h. Die Zellen wurden anschließend 5min mit EGF (1nM) stimuliert. Anschließend erfolgte die SDS- PAGE mit nachfolgendem Westernblot und Nachweis der phosphorylierten oder unphosphorylierten Proteine (nähere Beschreibung siehe Abb. 46). Diese Bilder stehen repräsentativ für zwei voneinander unabhängige Experimente mit Doppelbestimmung. (\* signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle)





**Abb. 54: Die Überexpression von c- Src und des EGF- Rezeptors bewirkt eine starke Zunahme der basalen Phosphorylierung von Y845.**

Die dargestellten Ergebnisse der SH- SYSY-, MCF-7-, H125-, SW- 480- und A431- Zellen wurden in Beziehung zu den jeweiligen Werten in COS- 7- Zellen gesetzt. Dabei wurden die in COS- 7- Zellen erhaltenen Werte gleich 100% gesetzt.

## 5. Diskussion

### 5.1. Vergleich der Isoprenalin- und LPA- induzierten Transaktivierung des EGFR

Die Transaktivierung des EGFR ist in den verschiedensten Zelllinien und für die verschiedensten GPCRs ein gut untersuchter Mechanismus. Dabei scheinen im allgemeinen zwei Grundprinzipien zu existieren: Auf der einen Seite die Transaktivierung über die Freisetzung von EGFR- Liganden (TMP- Signalweg) (Prenzel et al., 2001; Wetzker et al., 2003) und auf der anderen Seite die Transaktivierung über intrazelluläre Signalwege (Sabri et al., 2002; Buchanan et al., 2003; Shah et al., 2005). Für die Signalweiterleitung ist dabei in beiden Fällen die Dimerisierung der Rezeptormonomere und die dadurch vermittelte Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR entscheidend (Prenzel et al., 1999; Maudsley et al., 2000). Dabei haben beide Möglichkeiten der Transaktivierung eine Ras-abhängige Aktivierung von ERK1/2 zur Folge. Als typische Vertreter von GPCRs, die die Transaktivierung des EGFR über EGFR- Liganden auslösen, wurden der LPA- , der M1- und der Thrombinrezeptor ermittelt (Prenzel et al., 1999; Yan et al., 2002; Kalmes et al., 2000).

Ein anderer prototypischer GPCR, der sowohl zur Untersuchung der Transaktivierung als auch für die Untersuchung der Aktivierung von ERK1/2 herangezogen wurde, ist der  $\beta_2$ - AR. Dieser GPCR ist  $G_s$ - gekoppelt und vermittelt die Transaktivierung des EGFR und die Aktivierung von ERK1/2 über  $\beta\gamma$ - Komplexe der  $G_i$ - Proteine und über Src- Kinasen. Dabei wird die  $G_i$ - Kopplung des Rezeptors erst durch eine PKA- vermittelte Phosphorylierung des  $\beta_2$ - AR induziert und somit die c- Src abhängige Transaktivierung des EGFR ermöglicht (Daaka et al., 1997). Zusätzlich konnten noch eine Reihe alternativer und vermutlich zellspezifischer Signalwege identifiziert werden, die zu einer Isoprenalin-induzierten, jedoch EGFR- unabhängigen Aktivierung von ERK1/2 führen können. Dazu gehören zum Beispiel die Rap1- (Schmitt et al., 2000; Schmitt et al., 2002b), die Epac sowie die PLC $\epsilon$ - vermittelte Aktivierung von ERK1/2 (Keiper et al., 2004).

Während die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR gut charakterisiert ist, gibt es in der Literatur nur einen Hinweis in humanen Herz- Fibroblasten, dass durch den  $\beta_2$ - AR die Transaktivierung des EGFR über die Freisetzung von HB- EGF vermitteln werden kann (Kim et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transaktivierung des EGFR durch den endogen in COS- 7- Zellen exprimierten  $\beta_2$ - AR unabhängig von MMPs erfolgt (Abb. 6). Anhand verschiedener experimenteller Strategien, wie der Anwendung von PP2, der Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) oder der Verwendung von SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen, konnte hingegen nachgewiesen werden, dass  $\beta\gamma$ - Komplexe und c- Src für die Transaktivierung des EGFR und die Aktivierung von ERK1/2 essentiell sind. Dies bestätigt eindeutig die aus der Literatur bekannten Daten (Maudsley et al., 2000) und lässt darüber hinaus die Vermutung zu, dass die Isoprenalin-induzierte Transaktivierung in COS- 7- Zellen auf intrazellulärem Weg und offenbar durch eine direkte Phosphorylierung des EGFR durch c- Src zu erfolgen scheint.

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass c- Src durch den  $\beta_2$ - AR upstream des EGFR aktiviert wird. Im Gegensatz dazu scheinen Src- Kinasen bei der LPA- induzierten Transaktivierung in COS- 7- Zellen eher downstream des EGFR eine wichtige Rolle zu spielen. So ist beschrieben, dass die LPA- induzierte Aktivierung von ERK1/2, nicht jedoch die Transaktivierung PP2- sensitiv ist (Daub et al. 1997). Dies könnte bedeuten, dass Src- Kinasen bei der LPA- induzierten Transaktivierung möglicherweise keine Bedeutung haben (Abb. 55A).

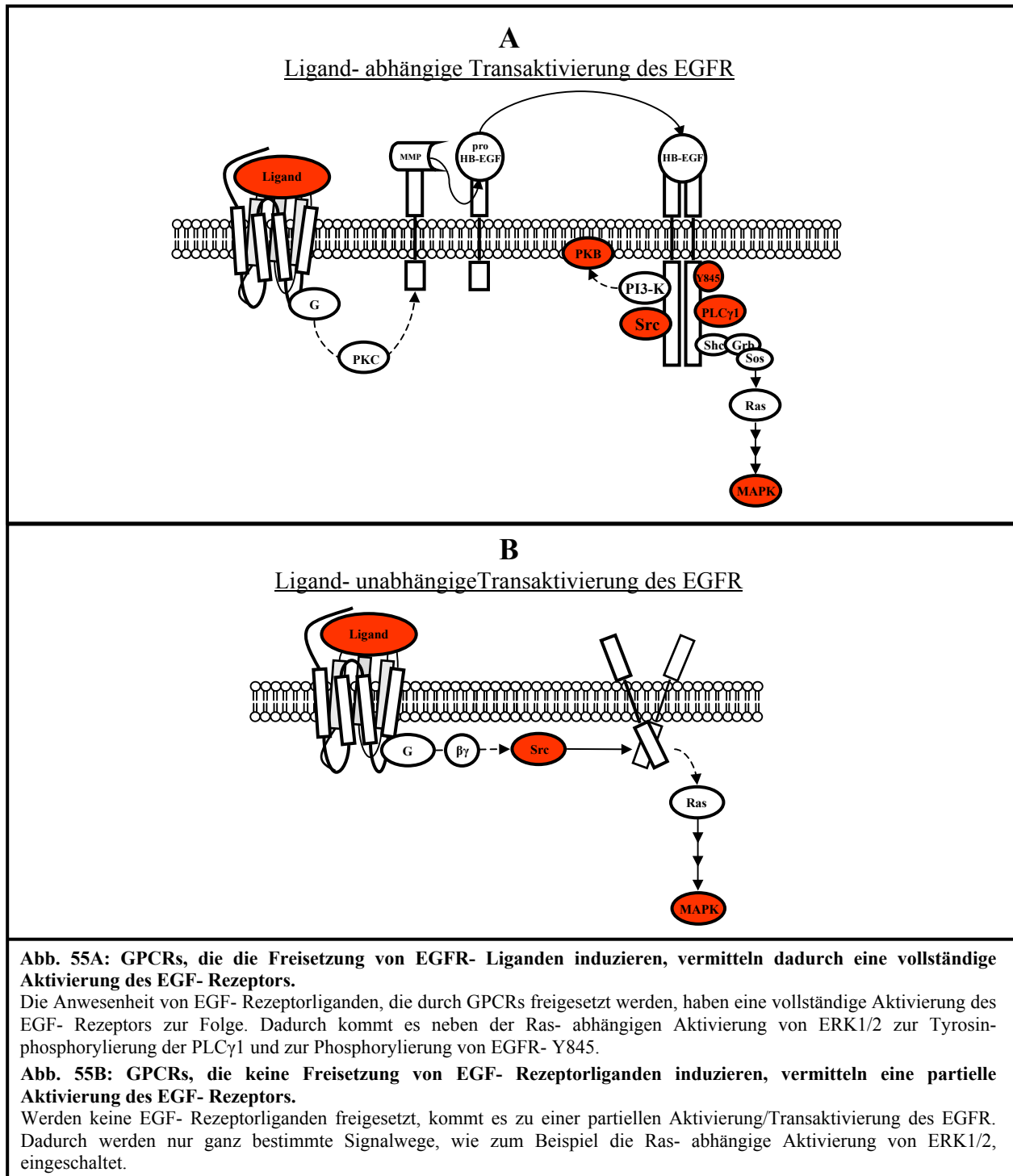
Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die fehlende GPCR- vermittelte Freisetzung von EGFR- Liganden dazu führt, dass Src- Kinasen upstream des EGFR benötigt werden, um auch ohne EGFR- Liganden die Tyrosinphosphorylierung und damit die Aktivierung des EGFR zu gewährleisten (Abb. 55B). Ähnlich Beispiele sind der EP-, der PAR1- und der LPA- Rezeptor, die in bestimmten Zelllinien die Transaktivierung unabhängig von MMPs über eine direkte c- Src- vermittelte Tyrosinphosphorylierung des EGFR induzieren (Sabri et al., 2002; Buchanan et al., 2003; Shah et al., 2005).

Ebenso wie nach Stimulierung mit EGF, erfolgt sowohl bei der Ligand- vermittelten Transaktivierung des EGFR (wie durch LPA) als auch bei der Ligand- unabhängigen Transaktivierung (wie durch Isoprenalin) offensichtlich immer die Stimulierung der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR und die Ras- abhängige Aktivierung von ERK1/2 (Crespo et al., 1995; Daub et al., 1997; Maudsley et al., 2000). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass sowohl Isoprenalin als auch LPA weitere Signalwege induzieren können, deren Einschaltung ebenfalls von der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR abhängig sind. Dabei stellte sich heraus, dass LPA neben der MMP- abhängigen Aktivierung von ERK1/2 und der PKB/Akt auch die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und die Phosphorylierung von EGFR- Y845 in Abhängigkeit von MMPs induzieren kann (Abb. 14). Somit scheint LPA die gleichen Signalwege wie EGF einschalten zu können. Im Gegensatz dazu erfolgt nach Transaktivierung des EGFR über den  $\beta_2$ - AR weder die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 oder der PKB/Akt noch die Phosphorylierung von EGFR- Y845 (Abb. 16).

Diese Befunde lassen vermuten, dass die Ligand- vermittelte, im Gegensatz zur Ligand- unabhängigen Transaktivierung des EGFR, zur Aktivierung der kompletten Signaltransduktion des EGFR führt (Abb. 55A). Dies könnte damit erklärt werden, dass LPA im Gegensatz zu Isoprenalin durch die Freisetzung von EGFR- Liganden eine direkte und vollständige Dimerisierung und Aktivierung/Transaktivierung des EGFR induzieren kann. LPA und EGF scheinen demnach das gleiche Aktivierungs- oder Autophosphorylierungsprofil des EGFR auszulösen.

Fehlt jedoch die Möglichkeit der Aktivierung von MMPs (wie bei der Stimulierung des  $\beta_2$ - AR), so muss die Dimerisierung und Tyrosinphosphorylierung des EGFR über intrazelluläre Tyrosinkinasen, wie zum Beispiel c- Src, vermittelt werden. Diese Form der Transaktivierung scheint jedoch weniger effizient als die Ligand- vermittelte Transaktivierung des EGFR zu sein. Ein Grund dafür könnte sein, dass c- Src upstream des EGFR und ohne EGFR- Liganden keine vollständige Dimerisierung und Aktivierung/Transaktivierung des EGFR induzieren kann. Dies scheint zur Folge zu haben, dass die Isoprenalin- induzierte und c- Src- vermittelte Transaktivierung nicht zur Phosphorylierung der

Tyrosinreste am EGFR führt, die als Andockstellen der PI3- Kinasen und der PLC $\gamma$ 1 notwendig sind (Abb. 55B).



Daher kann vermutet werden, dass die Ligand- unabhängige Transaktivierung nur eine partielle (Abb. 55B), und die Ligand- abhängige Transaktivierung dagegen eine vollständige Aktivierung des EGFR (Abb. 55A) zur Folge hat. Die Einteilung in partielle oder vollständige Transaktivierung des EGFR scheint auch auf andere GPCRs übertragbar zu sein. Zum Beispiel wird durch AngiotensinII in VSMC- Zellen über die Freisetzung von EGFR- Liganden eine vollständige Transaktivierung des EGFR induziert, die in der Phosphorylierung von EGFR- Y845, der Tyrosinphosphorylierung der

PLC $\gamma$ 1 sowie der Aktivierung von PKB/Akt und ERK1/2 resultiert (Schmitz et al., 1997; Ishida et al., 1997; Eguchi et al., 2001; Voisin et al., 2002; Haendeler et al., 2003).

Hinweise für eine partielle Transaktivierung gibt es auch in COS- 7- Zellen mit transient exprimiertem M2- Rezeptor. So führt die Stimulierung mit Carbachol zur MMP- unabhängigen Tyrosinphosphorylierung des EGFR sowie zur Stimulierung der Aktivitäten von ERK1/2 und der PKB/Akt, nicht jedoch zur Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 oder zur Phosphorylierung von EGFR- Y845 (*Dissertation J. Stirnweiss*).

Diese Vergleiche lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Ligand- unabhängige Transaktivierung des EGFR zellspezifisch und spezifisch für jeden GPCR zu bestimmten Transaktivierungs- und Signalweiterleitungsprofilen führt. Die Ligand- vermittelte Transaktivierung hingegen simuliert den Effekt von EGF und löst eine Signaltransduktion aus, die mit der von EGF identisch ist. Somit stellen diese beiden Formen der Transaktivierung unterschiedliche Mechanismen dar, über die die Aktivität und/oder die Autophosphorylierungsprofile des EGFR reguliert werden können.

Für eine vollständige und effiziente Aktivierung/Transaktivierung des EGFR über GPCRs scheinen dabei geringste Mengen von freigesetztem HB- EGF ausreichend zu sein. Wie sich zeigte, kann HB- EGF im Gegensatz zu EGF schon im subnanmolaren Bereich die Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 und von ERK1/2 vermitteln (Abb. 15). Diese hohe Effektivität ist notwendig, da die freigesetzten Mengen an HB- EGF durch die GPCR- vermittelte Aktivierung von MMPs sehr gering sind und neben der autokrinen auch die parakrine Stimulierung der Zellen ausgelöst wird (Pierce et al., 2001). Dabei wird die hohe Effektivität durch die Struktur des HB- EGFs hervorgerufen, die die Wechselwirkung mit Heperansulfat- Proteoglykanen der Zelloberflächen ermöglicht (Raab et al., 1997). Dies hat eine Erhöhung der lokalen Konzentration des HB- EGFs und dadurch auch bei sehr geringen Konzentrationen die effektive und vollständige Aktivierung des EGFR zur Folge (Prenzel et al., 1999).

### 5.2. Die Simulation der Ligand-vermittelten Transaktivierung durch Erhöhung der Basalaktivität des EGFR

Unter endogenen Bedingungen resultiert die Stimulierung des  $\beta_2$ - AR in der Tyrosinphosphorylierung des EGFR und der Aktivierung von ERK1/2, nicht jedoch in der Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 und der Phosphorylierung von EGFR- Y845. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings gezeigt werden, dass durch die Vorinkubation der Zellen mit EGF Isoprenalin in die Lage versetzt wird, die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und die Phosphorylierung von EGFR- Y845 zu erhöhen (Abb. 20). Daher kann vermutet werden, dass durch die Kostimulation der Zellen mit EGF und Isoprenalin die Ligand- vermittelte Transaktivierung simuliert werden kann.

Gleichmaßen konnte nachgewiesen werden, dass durch die Erhöhung der basalen Aktivität des EGFR (durch dessen Überexpression) Isoprenalin, ebenso wie EGF, die Phosphorylierung von EGFR- Y845 induzieren und die PLC $\gamma$ 1 aktivieren kann. Durch die Übereinstimmung der Ergebnisse in COS- 7- Zellen bei Kostimulation und EGFR überexprimierenden COS- 7- und A431- Zellen

(Abb. 20- 22), wird die Erhöhung der basalen Aktivität des EGFR als Präaktivierung oder Priming des EGFR definiert.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Hauptphosphorylierungsstellen Y1173 und Y992 am EGFR (Chattopadhyay et al., 1999) als Andockstellen für die PLC $\gamma$ 1 dienen. Da durch die Einzelstimulierung von COS- 7- Zellen keine Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 nachweisbar ist, kann vermutet werden, dass unter diesen Bedingungen die Andockstellen für die PLC $\gamma$ 1 am EGFR nicht durch Isoprenalin generiert werden können. Somit scheinen erst durch die Präaktivierung die Voraussetzungen am EGFR geschaffen zu werden, die dazu führen, dass die PLC $\gamma$ 1 zur Zellmembran und zum EGFR rekrutiert wird. Erst wenn diese Voraussetzung erfüllt ist, wird eine Isoprenalin- induzierte Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 möglich.

Die Bedeutung der Tyrosinkinaseaktivität des präaktivierten EGFR wurde dadurch gezeigt, dass der Inhibitor AG1478 die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 vollständig hemmt. Die Bedeutung der Autophosphorylierungsstellen EGFR- Y1173 und EGFR- Y992 für die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 konnte dadurch nachgewiesen werden, dass durch die Überexpression der EGFR- Mutanten EGFR- Y1173F und EGFR- Y992F ebenfalls die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 blockiert wird. Im Gegensatz dazu hat die Überexpression von EGFR- Y1068F (pY1068 ist die Andockstelle von Grb2 am EGFR) keinen negativen Einfluss auf die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 (Abb. 24, 25). Andererseits konnte gezeigt werden, dass Isoprenalin auch in Gegenwart eines präaktivierten EGFR im Unterschied zu EGF keine Phosphorylierung von EGFR- Y1173 induzieren kann. Dies ist ein Hinweis darauf, dass EGFR- Y1173 zwar wichtig für die Rekrutierung der PLC $\gamma$ 1 ist, die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 jedoch nicht über EGFR- Y1173 reguliert wird.

Ein neuer und hoch interessanter Befund ist, dass bei Überexpression von EGFR- Y845F (bei der die c- Src- spezifische Phosphorylierungsstelle am EGFR mutiert ist) anstelle des EGFR- WT ebenfalls keine Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 vermittelt werden kann (Abb. 28). Da Isoprenalin nach Präaktivierung des EGFR eine Phosphorylierung von EGFR- Y845 induziert, kann zwischen c- Src, EGFR- Y845 und der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 ein Zusammenhang vermutet werden. Mittels Koexpression von dnSrc (K295R/Y527F) und des EGFR- WT konnte diese Vermutung bestätigt und nachgewiesen werden, dass die  $\beta_2$ - AR- vermittelte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 von c- Src abhängig ist. Im Gegensatz dazu hatte weder die Überexpression von EGFR- Y845F noch von dnSrc (K295R/Y527F) einen Einfluss auf die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 (Abb. 27). Dies spricht dafür, dass EGFR- Y845 und c- Src nur für die GPCR-, nicht jedoch die EGFR- vermittelte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 von entscheidender Bedeutung sind.

Eine Bestätigung dafür, dass die Dimerisierung des EGFR, die durch die Präaktivierung hervorgerufen wird, essentiell für die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 ist, konnte durch die Überexpression der Dimerisierungsmutante EGFR-  $\Delta$ CR1 erhalten werden. So wurde gezeigt, dass

durch die Überexpression des EGFR-  $\Delta$ CR1 anstelle des EGFR- WT keine Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR, der PLC $\gamma$ 1 und auch keine Phosphorylierung von EGFR- Y845 erfolgen kann (Abb. 30). Dies lässt den Schluss zu, dass c- Src den EGFR-  $\Delta$ CR1 nicht phosphorylieren und daher auch nicht transaktivieren kann. c- Src benötigt offenbar die dimere Struktur des EGFR, um die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung und zusätzlich die Phosphorylierung von EGFR- Y845 und die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 zu bewirken. Interessant ist die Frage, warum erst durch die dimere Struktur des präaktivierten EGFR eine Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 induziert, und erst dadurch die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 ermöglicht wird. Eine Erklärung könnte sein, dass durch die dimere Struktur des präaktivierten EGFR die Wechselwirkung von c- Src (die über den  $\beta_2$ - AR aktiviert wird) und dem EGFR verstärkt wird und/oder erst dadurch die Zugänglichkeit von EGFR- Y845 für c- Src möglich ist. Aus diesem Grund wird c- Src nur unter diesen speziellen Bedingungen in die Lage versetzt, die Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 zusätzlich zu anderen Tyrosinresten am EGFR zu vermitteln.

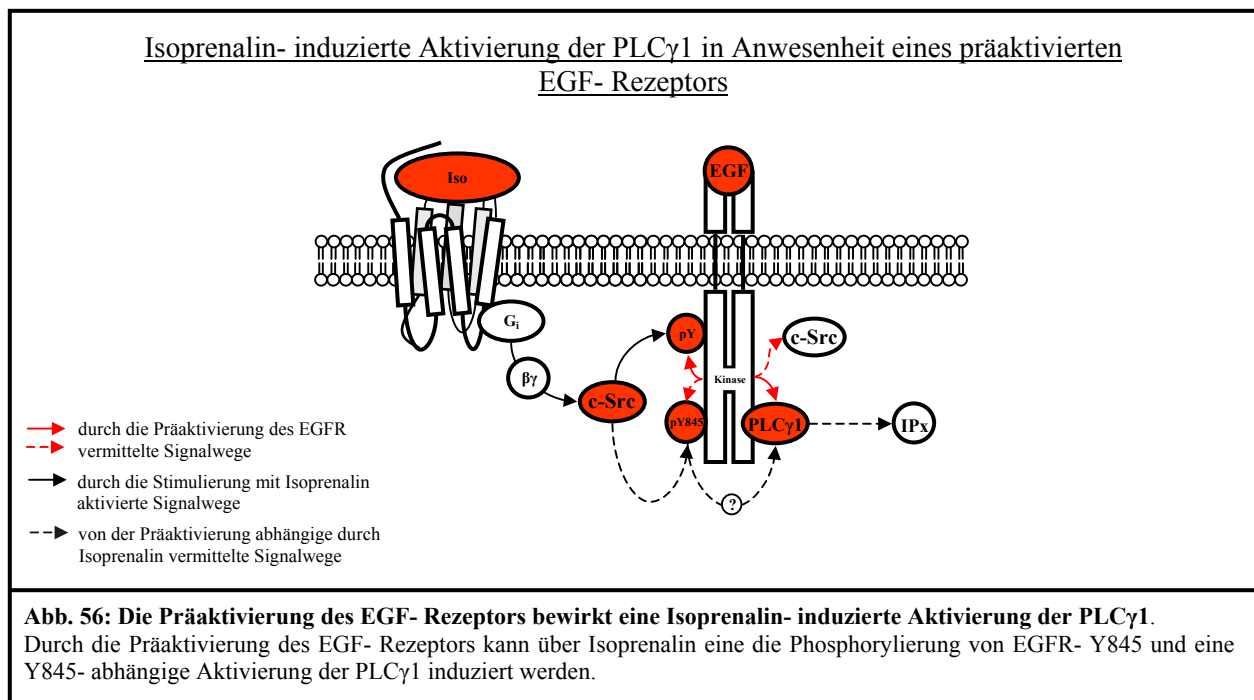
Anhand dieser Ergebnisse könnte man folgende Hypothese für die Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 und der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 in Anwesenheit eines präaktivierten EGFR aufstellen: Die Präaktivierung des EGFR hat zur Folge, dass die Autophosphorylierungsstellen Y1173 und Y992 am EGFR phosphoryliert vorliegen. Dadurch wird es der PLC $\gamma$ 1 ermöglicht, an den aktivierten EGFR anzudocken. Ferner werden erst durch die Präaktivierung des EGFR die Bedingungen geschaffen, die zu einer Isoprenalin- induzierten und c- Src- vermittelten Phosphorylierung von EGFR- Y845 führen. Erst dann kann durch die Stimulierung des  $\beta_2$ - AR unter Mitwirkung von EGFR- Y845 die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 erreicht werden (Abb. 56). Über den genauen Mechanismus, der zur Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 nach Präaktivierung des EGFR führt, kann jedoch nur spekuliert werden.

Dabei sind mehrere Möglichkeiten denkbar: Es könnte angenommen werden, dass Isoprenalin am präaktivierten EGFR durch die Phosphorylierung von EGFR- Y845 eine Sensitivierung der Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors induziert, wodurch es zu einer Zunahme der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 kommt. Ein ähnlicher Signalweg konnte bereits durch die Kostimulation von PC12- Zellen mit Bradykinin und EGF nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nach Stimulierung der Zellen mit EGF keine Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 nachweisbar ist. Erst wenn eine Vorinkubation der Zellen mit Bradykinin, und damit die Phosphorylierung von EGFR- Y845 erfolgte, konnte eine EGF- induzierte Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 nachgewiesen werden (Hur et al., 2004).

Denkbar ist auch, dass erst durch die Präaktivierung des EGFR und die dadurch hervorgerufene Rekrutierung der PLC $\gamma$ 1 zur Zellmembran die Stimulierung mit Isoprenalin dazu führt, dass c- Src (über den  $\beta_2$ - AR aktiviert) in räumliche Nähe zur PLC $\gamma$ 1 gebracht wird. Dies könnte zur Folge haben,

dass c- Src nur unter diesen Bedingungen in die Lage versetzt werden kann, die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 zu vermitteln. Da durch *in vitro*- als auch durch *in vivo*- Untersuchungen eine direkte Wechselwirkung von c- Src mit der PLC $\gamma$ 1 nachgewiesen werden konnte, wäre ein solcher Mechanismus auch bei der Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 denkbar (Nakanishi et al., 1993; Liao et al., 1993).

Eine mögliche Alternative für die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 wäre auch, dass dieser Signalweg über spezielle Dockinproteine reguliert wird. So konnte in vorangegangenen Arbeiten das Dockingprotein GIT1 als essentiell für die AngiotensinII- induzierte und c- Src- abhängige Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 identifiziert werden (Haendeler et al., 2003). Anhand dieser Ergebnisse kann auch für die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 eine Beteiligung dieses oder eines ähnlichen Dockingproteins nicht ausgeschlossen werden. Um eine genaue Aussage darüber treffen zu können, über welchen Signalweg die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 vermittelt wird, bedarf es noch weiterer Untersuchungen. Was hingegen schon jetzt deutlich wird, ist, dass EGFR- Y845 neben der EGF- induzierten STAT5b- vermittelten DNA- Synthese (Kloth et al., 2003) und der Vermittlung der Wechselwirkung mit CoxII (Cytochrom c Oxidase Untereinheit II) (Boerner et al., 2004) auch die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 regulieren kann.



Interessant ist darüber hinaus, dass die EGF- induzierte-, im Gegensatz zur Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1, unabhängig von c- Src vermittelt wird. Dies ist in der Hinsicht interessant, da sowohl EGF als auch Isoprenalin die Aktivierung von c- Src induzieren. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass c- Src spezifisch nur die Isoprenalin-, nicht jedoch die EGF- induzierte Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 vermittelt. Daher könnte vermutet werden, dass die verschiedenen Aktivierungsformen von c- Src, die durch EGF und Isoprenalin induziert werden (Goi et al., 2000), zu



unterschiedlichen Substratspezifität und daher auch zum Einschalten unterschiedlicher Signalwegen führt. Somit wäre denkbar, dass die Aktivierungsform von c- Src, die durch EGF induziert wird, nicht an der Aktivierung der PLC $\gamma$ 1, sondern an der Regulation anderer, durch EGF eingeschaltete Signalwege, beteiligt ist.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass Zellen über den Aktivierungs- und/oder Dimerisierungszustand sowie über das Expressionsniveau des EGFR regulieren können, welche GPCR- induzierten Signalwege eingeschaltet werden. Wird der EGFR nur in einem geringem Umfang (wie in COS- 7- Zellen unter endogenen Bedingungen) exprimiert, so induziert Isoprenalin ohne die Anwesenheit von EGFR- Liganden eine partielle Transaktivierung des EGFR, die nur zur Aktivierung von ERK1/2 führt. Im Gegensatz dazu kann LPA über die Freisetzung von EGFR- Liganden neben der Aktivierung von ERK1/2 auch die Aktivierung der PKB/Akt, die Phosphorylierung von EGFR- Y845 und die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 induzieren. Dies könnte zu der Frage führen, ob Isoprenalin durch die fehlende Freisetzung von EGFR- Liganden im Gegensatz zu LPA und EGF nicht nur ein anderes Tyrosinphosphorylierungsprofil, sondern auch einen anderen Dimerisierungsgrad des EGFR induziert.

In einer Reihe von Arbeiten wurde beschrieben wie die Ausbildung und Stabilisierung der EGFR- Dimere durch EGFR- Liganden vermittelt wird. So konnte gezeigt werden, dass die eigentliche Ligand- induzierte Stabilisierung der EGFR- Dimere extrazellulär über die Wechselwirkung der Subdomänen CR1 und CR2 vermittelt wird (Garrett et al., 2002; Ogiso et al., 2002; Walker et al., 2004; Abb. 1). Erst dadurch kommt es zu einer räumlichen Annäherung und zu Konformationsänderungen in den EGFR- Monomeren, was letztendlich zur vollständigen Transautophosphorylierung des Dimers führt. Dieser Mechanismus wäre somit auch die Folge der Ligand- abhängigen Transaktivierung. Wird die Transaktivierung hingegen nicht über EGFR- Liganden vermittelt, so kann vermutet werden, dass eine solche extrazelluläre Stabilisierung über die CR1- und CR2- Domänen ausbleibt und die richtige räumliche Orientierung der EGFR- Monomere fehlt. Dies hätte zur Folge, dass es zur Ausbildung instabiler und dadurch nur partiell transautophosphorylierter EGFR- Dimere kommt und dadurch die strukturellen Voraussetzungen für die Einschaltung der kompletten Signaltransduktion des EGFR fehlen. Dies könnte ein Erklärung dafür sein, dass die durch die Einzelstimulierung mit Isoprenalin induzierte Aktivierung/Transaktivierung des EGFR nur dazu in der Lage ist, eingeschränkt die Aktivierung bestimmter Signalwege, wie von ERK1/2, zu vermitteln. Durch die Präaktivierung und die dadurch vermittelte Stabilisierung der EGFR- Dimere können hingegen die Voraussetzungen geschaffen werden, die zur Einschaltung zusätzlicher Isoprenalin-induzierter Signalwege, wie der Phosphorylierung von EGFR- Y845 und der Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1, führen. Dies bestätigt die Annahme, dass die fehlende Freisetzung von EGFR- Liganden eine unvollständige Aktivierung/Transaktivierung des EGFR zur Folge hat. Desweiteren kann damit vermutet werden, dass die GPCR- vermittelte Aktivierung bestimmter EGFR- abhängiger Signalwege, wie die Aktivierung der PLC $\gamma$ 1, unter der Kontrolle von EGF stehen.

Liegt der EGFR überexprimiert vor, so ist die zusätzliche Anwesenheit von EGF für die Isoprenalin-induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 nicht mehr erforderlich. Unter solchen zellulären Bedingungen schafft der überexprimierte EGFR selbst die notwendigen Voraussetzungen für eine Isoprenalin-induzierte Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung der PLC $\gamma$ 1. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in A431-Zellen, die einen bis zu 100-fach überexprimierten EGFR aufweisen, eine Isoprenalin-induzierte Phosphorylierung von EGFR-Y845 und die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 stattfindet. Zusammenfassend macht dies deutlich, dass die Überexpression des EGFR zu Veränderungen GPCR-vermittelter Signalwege führen kann. Dabei können unter solchen zellulären Bedingungen GPCRs dazu befähigt werden, Signalwege zu aktivieren, deren Einschaltung ohne die Überexpression des EGFR nicht möglich wäre.

Die durch die Einzelstimulierung mit Isoprenalin induzierte Transaktivierung reicht für die Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 nicht aus. Die Aktivierung dieses Signalweges ist erst dann möglich, wenn am EGFR durch Kostimulation oder durch die Überexpression des EGFR (Erhöhung der basalen Aktivität) die Andockstellen für die PLC $\gamma$ 1 generiert wurden. Somit könnte man neben der bisher bekannten Ligand-vermittelten Transaktivierung durch GPCRs die Ligand- oder EGFR-unterstützte Transaktivierung als neuartigen Transaktivierungsmechanismus postulieren.

Unter physiologischen Bedingungen werden Zellen simultan durch verschiedene Liganden, wie Adrenalin und EGF, stimuliert. Auf der Suche nach der zellulären und physiologischen Konsequenz der Kostimulation konnte in dieser Arbeit ein additiver Effekt der Aktivierung von ERK1/2 bei Stimulierung mit Isoprenalin und suboptimalen EGF-Konzentrationen gefunden werden (Abb. 32). Bei höheren EGF-Konzentrationen ist dieser Effekt durch das "signal to noise"-Verhältnis schwer feststellbar. Dieser additive Effekt, nicht aber der Effekt von Isoprenalin und EGF allein, wird durch den PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid und die Downregulation der PKCs durch PMA blockiert (Abb. 35). Dabei wird der additive Effekt auf das Niveau herabgesetzt, das durch die Einzelstimulierung mit EGF oder Isoprenalin induziert wird.

Des Weiteren konnte durch die Überexpression der dominant-negativen Ras-Mutante N17Ras gezeigt werden, dass zwar die Einzeleffekte der Isoprenalin- und EGF-induzierten Aktivierung von ERK1/2 vollständig blockiert werden können, der additive Effekt der Aktivierung von ERK1/2 nach Kostimulation hingegen nur teilweise durch N17Ras blockierbar ist. Auch in diesem Fall geht die Aktivität von ERK1/2 auf das Niveau zurück, das durch die Einzelstimulierung mit EGF oder Isoprenalin erreicht werden kann (Abb. 36).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass bei der Einzelstimulierung mit Isoprenalin oder EGF die Aktivierung von ERK1/2 durch Ras vermittelt wird, jedoch unabhängig von PKCs erfolgt. Wie jedoch die PKC-vermittelte und partiell Ras-unabhängige Aktivierung von ERK1/2 nach Kostimulation erfolgt, kann momentan nur spekuliert werden. Die bisherigen Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass bei Vorinkubation mit EGF die Isoprenalin-induzierte Aktivierung von

ERK1/2 über einen EGFR/PLC $\gamma$ 1/PKC- vermittelten Mechanismus und daher unabhängig von Ras verläuft. Somit kann angenommen werden, dass die Vorinkubation mit EGF eine Umschaltung der Isoprenalin- vermittelten und Ras- abhängigen Aktivierung von ERK1/2 auf einen Ras- unabhängigen, jedoch PKC- vermittelten Mechanismus zur Aktivierung von ERK1/2 bewirkt.

PKC- vermittelte und Ras- unabhängige Signalwege sind in der Literatur beschrieben (Schönwasser et al., 1998) und beinhalten die PKC- vermittelte Aktivierung von ERK1/2 über die Raf- Kinase. Somit scheint erst durch die Kostimulation die Voraussetzung für eine Isoprenalin- induzierte und Ras- unabhängige Aktivierung von ERK1/2 über einen PKC- und Raf- abhängigen Mechanismus erfüllt zu sein.

Warum es bei Kostimulation zu einer Umschaltung von einer Ras- abhängigen zu einer Ras- unabhängigen Aktivierung von ERK1/2 kommt, ist unklar. Da die Präaktivierung des EGFR die Voraussetzung für die Isoprenalin- induzierte Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 ist, könnte vermutet werden, dass erst unter diesen Bedingungen eine duale Signalvermittlung zum Erreichen einer höheren Effektivität des ERK- Signalweges erzielt werden kann.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die additive Zunahme der Aktivität nicht durch eine einfache Summierung der Ras- abhängigen Einzelwege, die durch EGF und Isoprenalin vermittelt werden, zustande kommt. Vielmehr scheint es am EGFR durch Kostimulation oder durch dessen Überexpression zur Ausbildung von Proteinkomplexen zu kommen, über die die Signalwege, die zur Aktivierung von ERK1/2 führen, reguliert werden.

Andere Hinweise auf zellspezifische alternative Isoprenalin- induzierte Aktivierungsmöglichkeiten von ERK1/2 ergaben sich aus den Experimenten mit dem EGFR-  $\Delta$ CR1 und von SYF- Zellen. Wird durch die Überexpression des EGFR-  $\Delta$ CR1 der endogen exprimierte EGFR als Signaltransduktions- element für die  $\beta_2$ - AR- vermittelte Aktivierung von ERK1/2 verdrängt, kann die Aktivierung von ERK1/2 offensichtlich auch ohne den EGFR erfolgen. So konnte durch die Überexpression des EGFR-  $\Delta$ CR1 zwar die Isoprenalin- induzierte Transaktivierung und die Phosphorylierung von EGFR- Y845, nicht jedoch die Aktivierung von ERK1/2 blockiert werden (Abb. 31). Aufgrund der Hemmung der Isoprenalin- induzierten Transaktivierung und Phosphorylierung von EGFR- Y845 in EGFR-  $\Delta$ CR1- überexprimierenden Zellen kann daher vermutet werden, dass c- Src die veränderte Konformation des EGFR-  $\Delta$ CR1 (Garrett et al., 2002; Walker et al., 2004) nicht als Substrat erkennt. Aus diesem Grund wäre denkbar, dass erst durch die fehlende c- Src- abhängige Ansteuerung des EGFR das Einschalten eines alternativen und EGFR- unabhängigen Signalweges zur Aktivierung von ERK1/2 induziert wird. Fehlt c- Src als Signaltransduktionselement, wie zum Beispiel in Src- defizienten SYF- Zellen, so findet auch in diesen Zellen eine Isoprenalin- induzierte Aktivierung von ERK1/2 statt. Da auch der spezifische EGFR- Inhibitor AG1478 keine Hemmung der Isoprenalin- induzierten Aktivierung von ERK1/2 in diesen Zellen zeigt, kann geschlossen werden, dass die Aktivierung von ERK1/2 unabhängig von c- Src und dem EGFR über einen alternativen Signalweg erfolgt (Abb. 10).

Diese Ergebnisse belegen, dass bei fehlender Expression von c- Src oder durch die Überexpression des EGFR-  $\Delta$ CR1 alternative Signalwege zur Aktivierung von ERK1/2 eingeschaltet werden können. Welche Signalwege dies im einzelnen sind, ist unbekannt. In der Literatur sind jedoch einige Beispiele für alternative  $\beta_2$ - AR- vermittelte Signalwege beschrieben. Dabei handelt es sich um cAMP/PKA- oder cAMP/Epac- vermittelte Mechanismen, bei denen es zu einer EGFR- und Ras- unabhängigen Aktivierung von ERK1/2 kommt (Verheijen et al., 1997; Wan et al., 1998; Schmitt et al., 2000; Jiang et al., 2001; Schmitt et al., 2002; Klinger et al., 2002; Huang et al., 2004). Aus diesem Grund sind sowohl in EGFR-  $\Delta$ CR1- überexprimierenden COS- 7- als auch in SYF- Zellen ähnliche alternative Signalwege vorstellbar.

Wie aus diesen Ergebnissen weiterhin ersichtlich wird, scheint die Regulation des Dimerisierungszustandes und der Aktivität des EGFR ein entscheidender Kontrollmechanismus zu sein, über den reguliert werden kann, welcher Signalweg zur  $\beta_2$ - AR- vermittelten Aktivierung von ERK1/2 eingeschaltet wird. Erfolgt die Einzelstimulierung mit Isoprenalin, so kommt es über den partiell transaktivierten EGFR nur zur Aktivierung von ERK1/2. Weiterhin kann vermutet werden, dass die Hemmung der Dimerisierung des EGFR dazu führt, dass die Aktivierung von ERK1/2 über einen cAMP- vermittelten Mechanismus erfolgt. Wird hingegen eine vollständige Dimersierung des EGFR durch dessen Präaktivierung induziert, so kann angenommen werden, dass es über eine zusätzliche Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 zu einer Ras- unabhängigen, jedoch PKC- vermittelten Aktivierung von ERK1/2 kommt.

Ähnliche Mechanismen konnten auch für eine Reihe anderer GPCRs gefunden werden. Für den LPA- und den uPA- Rezeptor konnte gezeigt werden, dass der EGFR für die Aktivierung von ERK1/2 nicht unbedingt notwendig ist. So konnte in Zellen ohne EGFR- Isoformen eine LPA- und uPA- induzierte Aktivierung von ERK1/2 nachgewiesen werden. Die Transfektion des EGFR hatte zur Folge, dass die LPA- und uPA- induzierte Aktivierung von ERK1/2 MMP- abhängig über den transfizierten EGFR vermittelt wird (Cunnick et al., 1998; Buist et al., 1998; Jo et al., 2005).

Durch solche alternativen Signalwege stehen den GPCRs vielfältige Möglichkeit zur Verfügung, die Aktivierung bestimmter Signalproteine über verschiedene Signalwege zu der erreichen. Dadurch wird die fehlende Expression wichtiger Signaltransduktionsproteine ausgeglichen und durch die Einschaltung von alternativen Signalwegen ersetzt.

### 5.3. Src-Kinasen als spezifische Vermittler GPCR- induzierter mitogener Signalwege

Aus der Literatur ist bekannt, dass c- Src für die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR und die Aktivierung von ERK1/2 essentiell ist (Abb. 57A) (Luttrell et al., 1999; Maudsley et al., 2000). In dieser Arbeit konnte mittels verschiedener experimenteller Strategien, wie die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) und die Verwendung von Src- defizienten SYF- Zellen, nachgewiesen werden, dass c- Src ebenfalls an der Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 beteiligt ist. Ferner konnte mittels der Überexpression der inaktiven Fyn- Mutante K299M

gezeigt werden, dass die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und die Aktivierung von ERK1/2 spezifisch nur durch c- Src und nicht durch Fyn vermittelt wird (Abb. 40). Die spezifische Rolle von c- Src bei der Isoprenalin- induzierten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 wird auch bei Experimenten unter Verwendung von Src- defizienten SYF- Zellen, die weder c- Src, noch Fyn oder Yes exprimieren, und SYF<sup>+</sup>- Zellen, die nur c- Src exprimieren, bestätigt. So erfolgt bei Überexpression des EGFR nur in SYF<sup>+</sup>-, nicht jedoch in SYF- Zellen die Isoprenalin- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 (Abb. 29). Damit scheint c- Src für den  $\beta_2$ - AR eine spezifische Rolle zu spielen.

Im Gegensatz dazu wird die Carbachol- induzierte Transaktivierung des EGFR und die Aktivierung der PKB/Akt und von ERK1/2 über den muscarinischen M2- Rezeptor nur durch Fyn, nicht jedoch durch c- Src oder Yes vermittelt (Abb. 57B) (*Dissertation J. Stirnweiss*). Diese Ergebnisse wurden durch die jeweilige Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) oder der inaktiven Fyn Mutante K299M erzielt.

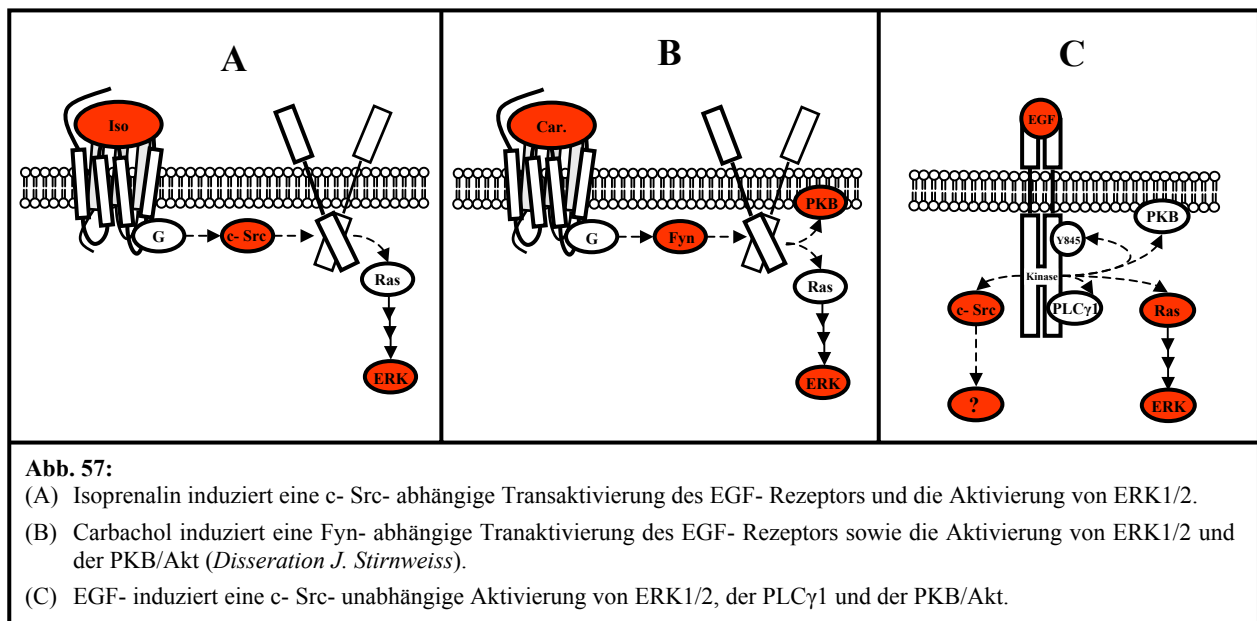
Um den Einfluss dieser Src- Kinasen auch bei EGF- induzierten mitogenen Signalwegen zu untersuchen, erfolgte die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) und der inaktiven Fyn- Mutante K299M. Wie sich jedoch herausstellte, zeigten diese Mutanten keinen Einfluss auf die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1, die Aktivierung der PKB/Akt oder die Aktivierung von ERK1/2. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass weder c- Src noch Fyn an der Vermittlung dieser Signalwege in COS- 7- Zellen beteiligt ist. Diese Ergebnis konnten auch durch die Verwendung von SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen bestätigt werden. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass in SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen, die Aktivierung dieser Signalwege im gleichem Ausmaß stattfindet und somit unabhängig von c- Src vermittelt werden.

In dieser Arbeit und der *Dissertation von Jörg Stirnweiss* konnte somit nachgewiesen werden, dass das Einschalten GPCR- vermittelter und EGFR- abhängiger Signalwege auch über verschiedene Src- Kinasen reguliert werden kann.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass Src- Kinasen hoch spezifische Tyrosinkinase sind, die nur an der Vermittlung ganz bestimmter GPCR- vermittelter und EGFR- abhängiger mitogener Signalwege beteiligt sind. Somit kann vermutet werden, dass die Variabilität GPCR- vermittelter Signalwege auch durch die Aktivierung unterschiedlicher Src- Isoformen zustande kommt, welche am EGFR verschiedene Transaktivierungs- und/oder Autophosphorylierungsmuster vermitteln.

Interessant ist darüber hinaus, dass die Vermittlung EGF- induzierter mitogener Signalwege in COS- 7- und SYF- Zellen unabhängig von c- Src zu erfolgen scheint (Abb. 57C). Da jedoch bekannt ist, dass in COS- 7- Zellen durch EGF die Aktivierung von c- Src induziert werden kann (*Dissertation S. Hanke*) muss vermutet werden, dass c- Src in COS- 7- Zellen an der Regulation anderer Signalwege beteiligt ist. Eine Möglichkeit liefert die Arbeit von Goi et al., 2000, die zeigt, dass c- Src downstream des  $\beta_2$ - AR in die Aktivierung von ERK1/2 involviert ist, während c- Src downstream des EGFR für

die Aktivierung von ERK1/2 keine Rolle spielt, dagegen aber die Regulation des Aktinzytoskelettes vermittelt (Boyer et. al., 1997; Goi et al., 2000). Dies bedeutet, das c- Src und Ras unabhängig voneinander in die Regulation verschiedener Signalwege involviert sein können.



Durch die Verwendung von PP2 und durch die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) ergaben sich bei einigen EGF- induzierten Signalwegen zum Teil sehr große Widersprüche zu Literaturdaten. Interessant ist dabei, dass bei GPCR- vermittelten Signalwegen, bei denen Src- Kinasen vermutlich upstream des EGFR eine wichtige Rolle spielen, sowohl die Verwendung von PP2 als auch die Überexpression von inaktiven Src- Mutanten zu übereinstimmenden Ergebnissen führte. So konnte sowohl die Isoprenalin-, als auch die Carbachol- induzierte Aktivierung von ERK1/2 durch PP2 und auch durch die Überexpression der jeweiligen Src- Mutanten in COS- 7- Zellen gehemmt werden. Diese Übereinstimmung lässt vermuten, dass bei diesen Signalwegen die Wirkung von PP2 auf die Hemmung von Src- Kinasen zurückzuführen ist.

Spielt c- Src hingegen downstream des EGFR eine entscheidende Rolle, so stimmen die Ergebnisse, die durch die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) und durch die Verwendung von PP2 erhalten wurden, nicht überein. So konnte die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2, der PKB/Akt und der PLCγ1 zwar durch PP2, nicht aber durch die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) blockiert werden (Abb. 37, 38). Dies ist deshalb interessant, da vor allem die EGF- induzierte Aktivierung von ERK1/2 in der Literatur als ein Signalweg beschrieben ist, der unter Beteiligung von c- Src vermittelt wird (Luttrell et al., 1996; Luttrell et al., 1997) und daher durch die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) hemmbar sein sollte.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass PP2 auch in Src- defizienten SYF- Zellen die Hemmung dieser EGF- induzierten Signalwege bewirkt. Dabei kann eine durch PP2 hervorgerufene unspezifische Hemmung des EGFR ausgeschlossen werden, da in Gegenwart von PP2 sowohl in COS- 7- Zellen als auch in SYF- Zellen die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGFR

unverändert bleibt (Daub et al., 1997; Sorkina et al., 2002; Abb. 37 und 41). Daraus könnte geschlussfolgert werden, dass zumindest einige der inhibitorischen Effekte von PP2 nicht auf die Hemmung von Src- Kinasen zurückzuführen sind. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Sorkina et al., 2002, die bei der Untersuchung der EGF- induzierten Internalisierung des EGFR ähnliche, durch PP2- hervorgerufene Hemmeffekte in SYF- Zellen beschrieben haben. Dabei konnte gezeigt werden, dass auch in Src- defizienten SYF- Zellen die EGF- induzierte Internalisierung des EGFR durch PP2 gehemmt werden kann.

Diese Ergebnisse reihen sich in die zum Teil sehr widersprüchlichen bisherigen Publikationen über PP2 und die Überexpression verschiedener dnSrc- Mutanten in COS- 7- Zellen ein (Tab. 1).

Ligand InM	Zelllinie	PP2	c- Src Mutante			Target	Effekt Hemmung	Referenz
			K295M	K298M	K295R/ Y527F			
EGF	COS-7			X		EGFR	++	Luttrell et al., 1997
				X		Shc	++	
EGF	COS-7		X			ERK1/2	-	Kranenburg et al., 1997
EGF	COS-7				X	PLC $\gamma$ 1	-	in dieser Arbeit gezeigt
					X	PKB	-	
					X	ERK1/2	-	
		10 $\mu$ M				EGFR	-	
		10 $\mu$ M				PLC $\gamma$ 1	++	
		10 $\mu$ M				PKB	++++	
		10 $\mu$ M				ERK1/2	++++	
EGF	COS-7	10 $\mu$ M				EGFR	-	Daub et al., 1997
		10 $\mu$ M				Shc	++	
		10 $\mu$ M				Gab1	++++	
		10 $\mu$ M				ERK1/2	++++	
EGF	SYF Src- defizient	10 $\mu$ M				EGFR	-	in dieser Arbeit gezeigt
		10 $\mu$ M				PLC $\gamma$ 1	++++	
		10 $\mu$ M				PKB	+++	
		10 $\mu$ M				ERK1/2	+++	

**Tab. 1:** - keine feststellbare Hemmung; ++ 50%ige Hemmung; +++ 75%ige Hemmung; ++++ vollständige Hemmung (Die Hemmeffekte beziehen sich auf die jeweiligen EGF- induzierten Werte.)

So ist aus Tab. 1 zu ersehen, dass die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung von Gab1, der Shc- Proteine sowie die Aktivierung von ERK1/2 in COS- 7- Zellen durch PP2 hemmbar ist (Daub et al., 1997). Des weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch PP2 auch die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und die Phosphorylierung von S473 der PKB/Akt gehemmt werden kann. Dabei konnten diese Signalwege durch eine PP2- Konzentration von 5 $\mu$ M signifikant um etwa 50% und mit einer Konzentration von 10 $\mu$ M vollständig gehemmt werden. Niedrigere Konzentrationen zeigten hingegen keine Wirkung. Die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF- Rezeptors bleibt dabei auch in Gegenwart von PP2 (10 $\mu$ M) unverändert.

Diese Ergebnisse stehen zum Teil im Einklang mit den Resultaten, die durch die Überexpression der Src- Mutante K298M in COS- 7- Zellen erhalten wurden. So konnte durch die Verwendung der Src- Mutante K298M sowohl eine leichte Hemmung der EGF- induzierten Tyrosinphosphorylierung der Shc- Proteine als auch eine Hemmung der EGF- induzierten Aktivierung von ERK1/2 hervorgerufen werden (Luttrell et al., 1996; Luttrell et al., 1997). Dies bestätigt die bisherigen Literaturdaten und weist auf eine Beteiligung von c- Src bei EGF- vermittelten mitogenen Signalwegen hin.

Interessant ist hingegen, dass durch die Überexpression der Src- Mutanten dnSrc (K295R/Y527F) oder K298M (Kranenburg et al., 1997) in COS- 7- Zellen keine Hemmung der EGF- induzierten mitogenen Signalwege hervorgerufen werden konnte. Dieses Ergebnis widerspricht den Resultaten, die nach Verwendung von PP2 und Überexpression von K298M erhalten wurden und legt nahe, dass nicht c- Src, sondern eine andere Tyrosinkinase diese Signalwege vermittelt.

Wodurch diese unterschiedlichen und widersprüchlichen Ergebnisse in COS- 7- Zellen nach Überexpression verschiedener inaktiver c- Src- Mutanten sowie nach Verwendung von PP2 hervorgerufen werden, ist unbekannt. Möglicherweise ist der Einsatz unterschiedlicher c- Src- Mutanten die Ursache dafür. Dabei ist nicht auszuschließen, dass die dominant- negative c- Src- Mutante, die in dieser Arbeit verwendet wurde, für die Untersuchung EGF- induzierter mitogener Signalwege nicht geeignet ist. Eine letztendliche Klärung des Einflusses von c- Src und der anderen Src- Kinasen auf diese Signalwege in COS- 7- Zellen könnte unter anderem durch die Verwendung der jeweiligen Src- Kinase- siRNA erfolgen.

Die Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit mit Src- defizienten SYF- Zellen erhalten wurden, legen jedoch die Schlussfolgerung nahe, dass die EGF- induzierte Aktivierung dieser Signalwege ohne Beteiligung von c- Src vermittelt werden kann.

Des weiteren könnte in Analogie zu den PP2- Effekten in SYF- Zellen auch in COS- 7- Zellen die Hemmwirkung von PP2 auf die Inhibierung anderer Tyrosinkinasen, die nicht mit c- Src, Fyn oder Yes identisch sind, zurückgeführt werden. Dies würde die Diskrepanz zwischen den durch PP2 hervorgerufenen Hemmeffekten und der Unwirksamkeit der dnSrc (K295R/Y527F) auf diese Signalwege in COS- 7- Zellen erklären.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird postuliert, dass in COS- 7- Zellen unter diesen zellulären Bedingungen die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 sowie die Aktivierung der PKB/Akt und von ERK1/2 ohne die Beteiligung von c- Src und Fyn vermittelt werden. Inwiefern andere cytosolische Src- Kinasen an diesen Signalwegen beteiligt sind, die die Hemmeffekte von PP2 in COS- 7- Zellen erklären würden, ist unbekannt.

Die Diskrepanzen, die bei Verwendung von PP2 und Überexpression bestimmter dominant- negativer Src- Mutanten auftreten können, machen eine vergleichende Analyse beider experimenteller Ansätze in jedem Versuch notwendig.



#### 5.4. c- Src- abhängige und c- Src- unabhängige Phosphorylierung von EGFR- Y845

Der Tyrosinrest EGFR- Y845 befindet sich auf der Aktivierungsschleife des EGFR und scheint an der Regulation der EGF- induzierten Proliferation beteiligt zu sein. Für verschiedene Tumorzelllinien wurde nachgewiesen, dass der Tyrosinrest EGFR- Y845 spezifisch durch c- Src phosphoryliert wird und keine Autophosphorylierungsstelle des EGFR selbst darstellt.

Die Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes führt in solchen Zellen zur Aktivierung der STAT5b- abhängigen DNA- Synthese (Kloth et al., 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass EGFR- Y845 in verschiedenen Tumorzelllinien essentiell an der Wechselwirkung des EGFR mit dem mitochondrialen Protein CoxII beteiligt ist (Boerner et al., 2004). Auf die EGF- induzierte Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 (Abb. 29B), die Phosphorylierung von S473 der PKB/Akt (Ergebnis nicht gezeigt) und die Ras- abhängige Aktivierung von ERK1/2 (Wu et al., 2002) hat dieser Tyrosinrest hingegen keinen Einfluss.

Die c- Src spezifische Phosphorylierung von EGFR- Y845 und die beschriebenen downstream- Effekte wurden allerdings bisher nur in Zellen nachgewiesen, die sowohl c- Src als auch den EGFR überexprimieren (Biscardi et al., 1999; Sato et al., 2003; Kloth et al., 2003). Im Gegensatz zur EGF- induzierten und c- Src- vermittelten Phosphorylierung von EGFR- Y845 in Tumorzellen mit überexprimiertem EGFR und überexprimierter c- Src, ist in COS- 7- Zellen (die beide Proteine nur in geringem Umfang exprimieren) die Phosphorylierung von EGFR- Y845 weder durch die Überexpression von dnSrc (K295R/Y527F) noch durch PP2 hemmbar. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für andere Zelllinien beschrieben. So konnte in RPTC- und GN4- Zellen eine PP2- insensitive EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 nachgewiesen werden (Gardner et al., 2003; Zhougang et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass EGF auch in Src- defizienten SYF- Zellen die Phosphorylierung von EGFR- Y845 induzieren kann (Abb.45). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass unter diesen zellulären Bedingungen die Phosphorylierung von EGFR- Y845 nicht durch c- Src und auch nicht durch Fyn oder Yes vermittelt wird. Welche Tyrosinkinase in COS- 7- und SYF- Zellen die Phosphorylierung von EGFR- Y845 induziert, ist noch unbekannt. Durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren konnten jedoch Jak2 und ErbB2 als mögliche Vermittler dieser Phosphorylierung in diesen Zellen ausgeschlossen werden (Abb. 47). Nur die Verwendung von AG1478 hatte in COS- 7-, SYF- und SYF<sup>+</sup>- Zellen eine vollständige Hemmung der EGF- induzierten Phosphorylierung von EGFR- Y845 zur Folge (Abb. 48, 50). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR essentiell an der Regulation der Phosphorylierung von EGFR- Y845 beteiligt ist.

Die Möglichkeit, dass EGFR- Y845 unter diesen Bedingungen ein direktes Substrat der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität des EGFR selbst ist, kann dabei jedoch ausgeschlossen werden, da dieser Tyrosinrest bisher nicht als Autophosphorylierungsstelle identifiziert wurde (Haskell 2001). Vielmehr

ist anzunehmen, dass möglicherweise eine bisher noch unbekannte Tyrosinkinase durch den EGFR aktiviert wird, die anschließend die Phosphorylierung von EGFR- Y845 vermittelt. Diese Ergebnisse beschränken die c- Src- vermittelte Phosphorylierung von EGFR- Y845 auf zelluläre Bedingungen, bei denen sowohl der EGFR als auch c- Src überexprimiert vorliegen. Um diese Schlussfolgerung zu bestätigen, wurden diese beiden Proteine in COS- 7- Zellen überexprimiert. Als Vergleich dienten A431- Zellen, die eine endogene Überexpression des EGFR und von c- Src aufweisen.

Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass unter diesen speziellen zellulären Bedingungen die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 durch PP2 gehemmt werden kann (Abb. 51, 52). Dies deutet darauf hin, dass die EGF- induzierte Phosphorylierung unter diesen Bedingungen durch c- Src vermittelt wird.

Durch die dargestellten Ergebnisse im vorangegangenen Abschnitt, die belegen, dass die Wirkung von PP2 auf EGF- induzierte Signalwege wahrscheinlich nicht auf die Hemmung von Src- Kinasen zurückzuführen ist, kann auch in diesem Fall eine eher unspezifische Wirkung von PP2 nicht ausgeschlossen werden. Da PP2 jedoch nur in c- Src- und EGFR- überexprimierenden Zellen eine Wirkung auf die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 hat, kann vermutet werden, dass in diesem speziellen Fall die Wirkung von PP2 auf die Hemmung von c- Src zurückgeführt werden kann.

Zur Bestätigung dieses Ergebnisses bedarf es jedoch noch weiterer Untersuchungen. Dabei empfiehlt sich besonders die Verwendung alternativer Src- Kinase- Inhibitoren, wie zum Beispiel von SU6656, der im Vergleich zu PP2 eine höhere Spezifität für Src- Kinasen aufweist (Sorkina et al., 2002).

Trotz der möglichen Nebeneffekte von PP2 lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die Phosphorylierung von EGFR- Y845 über alternative Signalwege vermittelt werden kann, deren Einschaltung offensichtlich von der zellulären Konzentration der beteiligten Signalproteine abhängig ist. Dies würde auch heißen, dass EGFR- Y845 und EGFR- Y1101 nur unter bestimmten zellulären Bedingungen spezifisch durch c- Src phosphoryliert werden.

Weiterhin ist interessant, dass in A431- Zellen die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 vollständig durch AG1478 inhibiert werden kann (Abb. 52). Dies lässt vermuten, dass es über die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR zu einer Aktivierung von c- Src kommen muss, bevor EGFR- Y845 c- Src- abhängig phosphoryliert werden kann. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Wu et al., 2002. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR essentiell für die EGF- induzierte Aktivierung von c- Src und die Phosphorylierung von EGFR- Y845 ist.

Im Gegensatz dazu wurde in A431- Zellen auch gezeigt, dass die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 nicht durch AG1478 hemmbar ist (Sato et al., 2003). Daraus kann man wiederum schließen, dass die Aktivierung von c- Src und die anschließende Phosphorylierung von EGFR- Y845 unabhängig von der Tyrosinkinaseaktivität des EGFR erfolgen kann. Die Ursachen für diese

unterschiedlichen Ergebnisse innerhalb einer Zelllinie sind unbekannt, könnten jedoch mit der Verwendung unterschiedlicher Chargen oder Subklone dieser Zelllinie zusammenhängen.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass auch die basale Phosphorylierung von EGFR- Y845 offenbar vom Expressionslevel sowohl von c- Src als auch des EGFR abhängig ist. So wurde gezeigt, dass Zellen, die entweder den EGFR oder c- Src überexprimieren, nur eine leichte Zunahme der basalen Phosphorylierung von EGFR- Y845 aufweisen. Werden hingegen, wie in A431- Zellen, beide Proteine überexprimiert (Olayioye et al., 1999; Sato et al., 2003), so steigt die basale Phosphorylierung von EGFR- Y845 um ein Vielfaches an (Abb. 53). Eine mögliche Erklärung dieser Ergebnisse wäre zum Beispiel, dass erst durch die gleichzeitige Überexpression des EGFR und von c- Src eine enge Assoziation beider Proteine induziert wird, die auch in nicht- stimulierten Zellen nachweisbar ist (Sato et al., 1995b; Olayioye et al., 1998; Biscardi et al., 1999; Haskell et al., 2001). Dies hat zur Folge, dass c- Src nur unter diesen speziellen pathophysiologischen Bedingungen in die Lage versetzt wird, EGFR- Y845 zu phosphorylieren. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Phosphorylierung von EGFR- Y845 nicht in jedem Fall auf die c- Src zurückgeführt werden kann. Vielmehr kann geschlussfolgert werden, dass die c- Src- abhängige Phosphorylierung von EGFR- Y845 an bestimmte pathophysiologische Bedingungen gebunden ist (Biscardi et al., 1999; Haskell et al., 2001).

Unsere Befunde lassen zusätzlich erkennen, dass eine Phosphorylierung von EGFR- Y845 über GPCRs und c- Src offenbar nur bei einer Ligand- vermittelten Transaktivierung des EGFR auftritt. So konnte bisher nur für den GnRH-, den Angiotensin-, den PAR1-, den Endothelin, den LPA- sowie den uPA- Rezeptor, welche die Transaktivierung des EGFR über die Freisetzung von EGFR- Liganden vermitteln, eine Phosphorylierung von EGFR- Y845 nachgewiesen werden (Haskell et al., 2001; Voisin et al., 2002; Roelle et al., 2003; Santiskulvong et al., 2003; Jo et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der  $\beta_2$ - AR die Transaktivierung des EGFR Ligand- unabhängig vermittelt. Überraschend war das Ergebnis, dass der  $\beta_2$ - AR zwar c- Src- abhängig den EGFR transaktivieren kann, jedoch nicht in der Lage ist, die Phosphorylierung von EGFR- Y845 zu vermitteln.

Erst durch die Kostimulation der Zellen mit EGF (Abb. 20B) oder durch die Überexpression des EGFR (Präaktivierung des EGFR) konnte eine Isoprenalin- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 nachgewiesen werden (Abb. 21B, 22B). Dadurch wird bestätigt, dass die EGF- Ligand- unabhängige Transaktivierung des EGFR nicht die Voraussetzungen für eine GPCR- vermittelte Phosphorylierung von EGFR- Y845 schaffen kann. Im Zusammenhang mit den bisherigen Veröffentlichungen kann daher vermutet werden, dass die Phosphorylierung von EGFR- Y845 nur dann c- Src abhängig erfolgen kann, wenn gleichzeitig ein EGFR- Ligand anwesend ist, oder der EGFR durch seine Überexpression eine erhöhte Tyrosinkinaseaktivität besitzt.

## 6. Zusammenfassung

G- Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) regulieren nicht nur den zellulären Metabolismus sondern beeinflussen auch die Zellproliferation. Hauptangriffspunkt für die GPCRs ist dabei der Epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR)- Extrazellulär- Regulierte Kinase (ERK)- Signalweg. Für die Aktivierung von ERK1/2 durch GPCRs wurden bisher zwei molekulare Mechanismen identifiziert:

### (1.) Ligand- vermittelte Aktivierung (Ras- abhängig)

GPCRs induzieren eine Tyrosinphosphorylierung und damit die Transaktivierung des EGFR. Dazu werden G- Protein- vermittelt bestimmte Matrixmetalloproteinasen (MMPs) aktiviert, die aus einem membranständigen Precursor Peptide der EGF- Familie (wie z.B.: HB- EGF) freisetzen, die anschließend an den EGFR binden.

### (2.) Ligand- unabhängige Aktivierung (Ras- unabhängig)

Für einige Zellen und GPCRs konnte gezeigt werden, dass bestimmte PKC- Isoformen, die über den  $G_q$ - Protein- PLC $\beta$ - Signalweg aktiviert werden, eine Stimulierung der ERK1/2- Aktivität auf der Ebene der Raf- Kinase, also downstream des EGFR, vermitteln.

In der vorliegenden Arbeit wurde am Expressionsmodell COS- 7 unter endogenen Bedingungen gezeigt, dass die Transaktivierung des EGFR durch den  $\beta_2$ - adrenergen Rezeptor ( $\beta_2$ - AR) unabhängig von der MMP- Aktivierung induziert wird, allerdings  $\beta\gamma$ - Komplexe und c- Src upstream des EGFR involviert sind. Der  $\beta_2$ - AR löst dabei jedoch nur eine partielle Transaktivierung des EGFR aus. Das bedeutet, dass nur die Aktivierung von ERK1/2, nicht aber der PLC $\gamma$ 1 und des PI3- Kinase/PKB- Signalweges durch den  $\beta_2$ - AR über die Transaktivierung des EGFR vermittelt werden kann. Im Gegensatz dazu führt die Stimulierung des EGFR mit EGF, HB- EGF oder des Lysophosphatidsäure- Rezeptors (LPA- Rezeptor) (über die Freisetzung von HB- EGF) zu einem kompletten "downstream Signalling" des EGFR.

Die Vorinkubation von COS- 7- Zellen mit EGF (Simulierung der Ligand- vermittelten Transaktivierung) befähigt den  $\beta_2$ - AR zu einer zusätzlichen Aktivierung der PLC $\gamma$ 1. Dieses Aktivierungsmuster kann auch erreicht werden, wenn die Präaktivierung des EGFR durch dessen Überexpression (Erhöhung der Basalaktivität) erfolgt. In der epidermalen Tumorzelllinie A431, die den EGFR 100-fach überexprimiert, wurde unter diesen endogenen pathophysiologischen Bedingungen ebenfalls die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 und die Erhöhung der Insitolphosphatfreisetzung gefunden. Mittels verschiedener EGFR- Mutanten konnte nachgewiesen werden, dass die Generierung der Autophosphorylierungsstellen Y1173 und Y992 durch die Präaktivierung des EGFR eine essentielle Voraussetzung für die Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 über den  $\beta_2$ - AR darstellt. Die spezifische Rolle von c- Src konnte zusätzlich durch dominant- negative Mutanten von c- Src und Fyn sowie durch Experimente mit SYF- Zellen (c- Src-, Fyn- und Yes- defizient) und SYF<sup>+</sup>- Zellen (Fyn- und Yes- defizient) bestätigt werden.

Als zelluläre Reaktion bei Kostimulation von COS- 7- Zellen mit submaximalen EGF-Konzentrationen und Isoprenalin wurde eine additive Stimulierung von ERK1/2 festgestellt. Diese ist sowohl partiell unabhängig von Ras als auch partiell abhängig von PKCs und kann auf die  $\beta_2$ - AR-vermittelte Aktivierung der PLC $\gamma$ 1 zurückgeführt werden. Mit diesen Ergebnissen konnte erstmals der Mechanismus einer **Ligand- unterstützten Transaktivierung** des EGFR als neuartiger Transaktivierungsmechanismus identifiziert werden.

Der Tyrosinrest Y845 des EGFR (EGFR- Y845) ist in der Literatur als eine c- Src- spezifische Phosphorylierungsstelle und nicht als Autophosphorylierungsstelle des EGFR beschrieben. Als downstream Targets von EGFR- pY845 wurden bisher in Tumorzelllinien, die den EGFR und c- Src überexprimieren, STAT5b und CoxII identifiziert. In dieser Arbeit wurde in COS- 7- Zellen mit überexprimiertem EGFR eine essentielle Abhängigkeit der  $\beta_2$ - AR vermittelten Tyrosinphosphorylierung der PLC $\gamma$ 1 als neuer EGFR- Y845- abhängiger Signalweg gefunden. Während unter Überexpressionsbedingungen die EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 als c- Src- abhängig nachgewiesen wurde, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass unter endogenen Bedingungen in COS- 7- Zellen EGFR- Y845 unabhängig von c- Src phosphoryliert wird. Diese c- Src- unabhängige, EGF- induzierte Phosphorylierung von EGFR- Y845 konnte auch in Src- defizienten SYF- Zellen bestätigt werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es unter bestimmten zellulären Bedingungen alternative Signalwege gibt, die unabhängig von c- Src die Phosphorylierung von EGFR- Y845 vermitteln können.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die Stimulierung unterschiedlicher GPCRs ( $\beta_2$ - AR) verschiedene Transaktivierungsprofile auslösen können. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der EGFR nicht nur ein intermediäres Signalprotein für GPCRs darstellt, sondern vielmehr als molekularer Schalter agiert, über den das zelluläre Signaltransduktionsnetzwerk differentiell reguliert werden kann. Weiterhin lässt sich schlussfolgern, dass sowohl durch die Überexpression des EGFR als auch durch dessen Kostimulation Signalwege durch GPCRs möglich werden, die bei deren selektiver Stimulierung nicht aktiviert werden können. Solche differentiellen Transaktivierungsmuster des EGFR könnten möglicherweise klinische Relevanz besitzen. Kürzlich wurde berichtet, dass einzelne Mutationen des EGFR zu einer erhöhten Tyrosinkinaseaktivität gegenüber EGF und zu einer Insensitivität gegenüber von Kinaseinhibitoren wie Gefitinib führen (Lynch et al., 2004). Auf der Basis der vorliegenden Befunde könnte man spekulieren, dass aus der permanenten therapeutischen Aktivierung bestimmter GPCRs Aktivierungsmuster des EGFR resultieren, bei denen ebenfalls die Sensitivität gegenüber bestimmten Krebstherapeutika verändert ist.

---

**Referenzen**

- 1 Abrahamsen, H., Vang, T., and Tasken, K. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 17170-17177
- 2 Adomeit, A., Graness, A., Gross, S., Seedorf, K., Wetzker, R., and Liebmann, C., (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5289-5297
- 3 Altschuler, D.L., Petreson, S.N., Ostrowski, M.C., and Lapetina, G. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10373-10376
- 4 Andreev, J., Galisteo, M.L., Kranenburg, O., Logan, S.K., Chiu, E.S., Okigaki, M., Cary, L.A., Moolenaar, W.H., and Schlessinger, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 20130-20135
- 5 Barbier, A.J., Poppleton, H.M., Yigzaw, Y., Mullenix, J.B., Wiepz, G.J., Bertics, P.J., and Patel, T.B.(1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 14067-14073
- 6 Biscardi, J.S., Ishizawar, R.C., Silva, C.M., and Parson, S.J. (2000) *Breast Cancer Res.* **2**, 203-210
- 7 Biscardi, J.S., Tice, D.A., and Parsons, S.J. (1999a) *J. Adv. Cancer Res.* **61**, 76-83
- 8 Biscardi, J.S., Maa, M.-C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.-H., and Parson, S.J. (1999b) *J. Biol. Chem.* **274**, 8335-8343
- 9 Boerner, J.L., Demory, M.L., Silva, C., and Parsons, S.J. (2004) *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7059-7071
- 10 Boyer, B., Roche, S., Denoyelle, M., and Thiery, J.P. (1997) *EMBO J.* **16**, 5904-5913
- 11 Brautigam, D.L., Bornstein, P., and Gallis, B. (1981). *J. Biol. Chem.* **256**, 6519-6522
- 12 Brown, M.T, and Cooper, J.A. (1996) *Biochem. Biophys. Acta* **1287**, 121-131
- 13 Buchanan, F.G., Wang, D., Bargiacchi, F., and DuBios, R.N. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 35451-35457
- 14 Buist, A., Tertoolen, L.G.J., and denHertog, J. (1998) *Biochim. Biophys. Res. Com.* **251**, 6-10
- 15 Burgering, B.M., Pronk, G.J., Weeren, P.C., Chardin, P., and Bos, J.L. (1993) *EMBO J.* **12**, 4211-4220
- 16 Burgess, A.W., Cho, H.-S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P.J., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S. (2003). *Mol. Cell.* **12**, 541-552
- 17 Chattopadhyay, A., Vecchi, M., Ji, Q.-S., Mernaugh, R., and Carpenter, G. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 26091-26097
- 18 Cook, S.J., and McCormick, F. (1993) *Science* **262**, 1069-1072
- 19 Countaway, J.L., Nairn, A.C., and Davis, R.J. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 1129-1140
- 20 Crepieux, P., Maroin, S., Martinat, N., Fafeur, V., Vern, Y.L., Kerboeuf, D., and Reiter, E. (2001) *Oncogene* **20**, 4696-4709
- 21 Crespo, P., Cachero, T.G., Xu, N., and Gutkind, J.S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 25259-25265
- 22 Crespo, P., Xu, N., Simonds, W.F., and Gutkind, J.S. (1994) *Nature* **369**, 418-421

- 
- 23 Cunnick, J.M., Dorsey, J.F., Standley, T., Turkson, J., Kraker, A.J., Fry, D.W., Jove, R., and Wu, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14468-14475
  - 24 Daaka, Y. (2002) *Biochem. Biophys. Acta* **1582**, 265-269
  - 25 Daaka, Y., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (1997) *Nature* **390**, 88-91
  - 26 Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrich, A., and Ullrich, A. (1997). *EMBO J.* **16**, 7032-7044
  - 27 Davis, R.J. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 9462-9469
  - 28 DeVos, A.M., Ultsch, M., and Kossiakoff, A.A: (1992). *Science* **225**, 306-312
  - 29 Dhillon, A.S., Meikle, S., Yazici, Z., Eulitz, M., and Kolch, W. (2002) *EMBO J.* **21**, 64-71
  - 30 Dikic, I., Tokiwa, G., Lev, S., Courtneidge, S., and Schlessinger, J. (1996) *Nature* **383**, 547-551
  - 31 Dugan, L.L., Kim, J.S., Zhang, Y., Bart, R.D., Sun, Y., Holtzman, D.M., and Gutmann, D.H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25842-25848
  - 32 Eguchi, S., Dempsey, P.J., Frank, G.D., Motley, E.D., and Inagami, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 7957-7962
  - 33 Faure, R., Baquiran, G., Bergeron, J.J.M., and Posner, B.I. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 11215-11221
  - 34 Faure, M., Voino-Yasenitskaya, T.A., van Biesen, T., and Bourne, H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 7851-7859
  - 35 Feinmesser, R.L., Wicks, S.J., Taverner, C.J., and Chantry, A. (1999). *J. Biol. Chem.* **274**, 16168- 16173
  - 36 Ferguson, K.M., Berger, M.B., Mendrola, J.M., Cho, H.-S., Leahy, D.J., and Lemmon, M.A. (2003) *Mol. Cell* **11**, 507-517
  - 37 Ferguson, K.M., Darling, P.J., Mohan, M.J., Macatee, T.L., and Lemmon M.A. (2000) *EMBO J.* **19**, 4632-4643
  - 38 Fitzgerald, M.L., Wang, Z., Park, P.W., Murphy, G., and Bernfield, M. (2000) *J. Cell. Biol.* **148**, 811- 824
  - 39 Fujita, T., Meguro, T., Fukuyama, R., Nakamuta, H., and Koida, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 22191- 22200
  - 40 Gardner, O.S., Dewar, B.J., Earp, H.S., Samet, J.M., and Graves, L.M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 46261-46269
  - 41 Garrett, T.P., McKern, N.M., Lou, M., Elleman, T.C., Adams, T.E., Lovrecz, G.O., Zhu, H.-J., Walker, F., Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002) *Cell* **110**, 775-787
  - 42 Goi, T., Shipitsi, M., Lu, Z., Foster, D.A., Klitz, S.G., and Feig, L.A. (2000) *EMBO J.* **19**, 623-630
  - 43 Gotoh, N., Tojo, A., Hino, M., Yazaki, Y., and Shibuya, M. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 768-774

- 
- 44 Graneß, A., Adomeit, A., Heinze, R., Wetzker, R., and Liebmann, C. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32016-32021
- 45 Graves, L.M., Bornfeld, K.E., Raines, E.W., Potts, B.C., MacDonald, S.G., Ross, R., and Krebs, E.G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10300-10304
- 46 Greenberg, A.S., Shen, W.-J., Muliro, K., Patel, S., Souza, S.C., Roth, R.A., and Kraemer, F.B. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45456-45461
- 47 Gschwind, A., Hart, S., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2003) *EMBO J.* **22**, 2411-2421
- 48 Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M., and Ullrich, A. (2001) *Oncogene* **20**, 1594-1600
- 49 Haendeler, J., Yin, G., Hojo, Y., Hojo, J., Saito, Y., Melaragno, M., Yan, C., Sharma, V.K., Heller, M., Aebersold, R., and Berk, B.C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 49936-49944
- 50 Hart, S., Fischer, O.M., and Ullrich, A. (2004) *Cancer Res.* **15**, 1943-1950
- 51 Haskell, M.D., Slack, J.K., Parson, T., and Parson, S.J. (2001) *Chem. Rev.* **101**, 2425-2440
- 52 Hawes, B.E., van Biesen, T., Koch, W.J., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 17148-17152
- 53 Häfner, S., Adler, S.H., Mischak, H., Janosch, P., Heidecker, G., Wolfman, A., Pippig, S., Lohse, M., Ueffing, M., and Kolch, W. (1994) *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6696-6704
- 54 Huang, G.C., Ouyang, X., Epstein, R.J. (1998) *Biochem. J.* **331**, 113-119
- 55 Huang, J., Sun, Y., and Huang, X.-Y. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 21637-21642
- 56 Hubbard, S.R., Mohammadi, M., and Schlessinger, J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 11987-11990
- 57 Hunter, T., Ling, N., and Cooper, J.A. (1984). *Nature* **311**, 480-483
- 58 Hur, E.-M., Park, Y.-S., Lee, B.D., Jang, I.H., Kim, H.S., Kim, T.-D., Suh, P.-G., Ryu, S.H., and Kim, K.-T. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 5852-5860
- 59 Huse, M., and Kuriyan, J. (2002). *Cell* **109**, 275-282
- 60 Ishida, M., Ishida, T., Thomas, S.M., and Berk, B.C. (1998) *Circ. Res.* **82**, 7-12
- 61 Jiang, Y., Cypress, A.M., Muse, E.D., Wu, C.-R., Unson, C.G., Merrifield, R.B., and Sakmar, T.P. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10102-10107
- 62 Jiang, G., and Hunter, T. (1999). *Curr. Biol.* **9**, R568-R571
- 63 Jo, M., Thomas, K.S., Marozkina, N., Amin, T.J., Silva, C.M., Parsons, S.J., and Gonias, S.L. (2005) *J. Biol. Chem.* in press
- 64 Kalmes, A., Vesti, B.R., Daum, G., Abraham, J.A., and Clowes, A.W. (2000) *Circ. Res.* **87**, 92-98
- 65 Keilhack, H., Tenev, T., Nyakatura, E., Godovac-Zimmermann, J., Nielsen, L., Seedorf, K., and Böhmer, F.D. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**, 24839-24846
- 66 Keiper, M., Stope, M.B., Szatkowski, D., Böhm, A., Tysack, K., vomDorp, F., Saur, O., Weernink, P.A.O., Evellin, S., Jakobs, K.H., and Schmidt, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 46497-46508



- 
- 67 Kim, J., Eckhart, A.D., Eguchi, S., and Koch, W. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32116-32123
- 68 King, C.R., Borello, I., Bellot, F., Cornoglio, P., and Schlessinger, J. (1988) *EMBO J.* **7**, 1647-1651
- 69 Klinger, M., Kudlacek, O., Seidel, M.G., Freissmuth, M., and Sexl, V. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 32490-32497
- 70 Kloth, M.T., Laughlin, K.K., Biscardi, J.S., Boerner, J.L., Parson, S.J., and Silva, C.M. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 1671-1679
- 71 Kobierski, L.A., Wong, A.E., Srivastava, S., Borsook, D., and Hyman, S.E. (1999) *J. Neurochem.* **73**, 129-138
- 72 Koch, W.J., Hawes, B.E., Allen, L.F., and Lefkowitz R.J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12706-12710
- 73 Kouhara, H., Hadari, Y., Spivak-Kriozman, T., Schilling, J., Bar-Sagi, D., Lax, I., and Schlessinger, J. (1997). *Cell* **89**, 693-702
- 74 Kossiakoff, A.A., and de Vos, A.M. (1998). *Adv. Protein Chem.* **52**, 67-108
- 75 Kranenburg, O., Verlaan, I., Hordijk, P.L., and Moolenaar, W.H. (1997) *EMBO J.* **16**, 3097-3105
- 76 Kraus, S., Outhiriaradjou, B., Zvi, N., and Seger, R. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 32618-32630
- 77 Kurosu, H., Maehama, T., Okada, T., Yamamoto, T., hoshino, S.-I., Fukui, Y., Ui, M., Hazeki, O., and Katada, T. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24252-24256
- 78 Kuppuswamy, D., Dalton, M., and Pike, L.J. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**, 19134-19242
- 79 Laffargue, M., Raynal, P., Yart, A., Peres, C., Wetzker, R., Roche, S., Payraastre, B., and Chap, H. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 32835-32841
- 80 Leaman, D.W., Leung, S., Li, X., and Stark, G.T. (1996) *FASEB J.* **10**, 1578-1588
- 81 Lemmon, M. A., Bu, Z., Ladbury, J.E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., Engelman, D. M., and Schlessinger, J. (1997) *EMBO J.* **16**, 281-294
- 82 Leopoldt, D., Hanck, T., Exner, U., Maier, R., Wetzker, R., and Nürnberg, B. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 7024-7030
- 83 Levitzki, A., and Gazit, A. (1995) *Science* **267**, 1782-1785
- 84 Liao, F., Shin, H.S., and Rhee, S.G. (1993) *Biochim. Biophys. Res. Com.* **191**, 1028-1033
- 85 Lindquist, J.M., Fredriksson, J.M., Rehnmark, S., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 22670-22677
- 86 Lopez-Illasaca, M., Crespo, P., Pellici, G., Gutkind, J.S., and Wetzker, R. (1997) *Science* **275**, 394-397
- 87 Luttrell, L.M., Della Rocca, G.J., vanBiesen, T., Luttrell, D.K., and Lefkowitz, R.J. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 4637-4644
- 88 Luttrell, L.M., Ferguson, S.S.G., Daaka, Y., Miller, W.E., Muadsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F.-T., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G., and Lefkowitz, R.J. (1999) *Science* **283**, 655-660

- 
- 89 Luttrell, L.M., Hawes, B.E., van Biesen, T., Luttrell, D.K., Lausig, T.J., and Lefkowitz, R.J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19443-19449
- 90 Luttrell, D.K., Luttrell, L.M., and Parson, S.J. (1988) *Mol. Cell. Biol.* **8**, 497-501
- 91 Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., et al., (2004) *N. Engl. J. Med.* **350**, 2129-2139
- 92 Ma, Y.-C., Huang, J., Ali, S., Lowry, W., and Huang, X.-Y. (2000) *Cell* **102**, 635-646
- 93 Maa, M.-C., Leu, T.-H., McCartney, D.J., Schatzman, R.C., and Parson, S.J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6981-6985
- 94 Maier, U., Babich, A., Mecrez, N., Leopoldt, D., Gierschik, P., Illenberger, D., and Nürnberg, B. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 13746-13754
- 95 Maier, U., Babich, A., and Nürnberg, B. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 29311-29317
- 96 Mattoon, D., Klein, P., Lemmon, M.A., Lax, I., and Schlessinger, J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 923-928
- 97 Maudsley, S., Pierce, K.L., Zamah, A.M., Miller, W.E., Ahn, S., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J., and Luttrell, L.M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 9572-9580
- 98 McCole, D.F., Keely, S.J., Coffey, R.J., and Barrett, K.E. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 42603-42612
- 99 Mendrola, J.M., Berger, M.B., King, M.C., and Lemmon, M.A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 4704-4712
- 100 Mischak, H., Seitz, T., Janosch, P., Eulitz, M., Stehen, H., Scheler, M., Philipp, A., and Kolch, W. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5409-5418
- 101 Naga Prasad, S.V., Barak, L.S., Rapacciuolo, A., Caron, M.G., and Rockman, H.A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 18953-18959
- 102 Nakanishi, O., Shibasaki, F., Hidaka, M., Homma, Y., and Takenawa, T. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 10754-10759
- 103 Northwood, I.C., Gonzalez, F.A., Wartmann, M., Raden, D.L., and Davis, R.J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15266-15276
- 104 Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J.-H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002) *Cell* **110**, 775-787
- 105 Okada, T., Hazeki, O., Ui, M., and Katada, T. (1996) *Biochem. J.* **317**, 475-480
- 106 Olayioye, M.A., Beuvink, I., Horsch, K., Daly, J.M., and Hynes, N.E. (1998). *J. Biol. Chem.* **274**, 17209-17218
- 107 Osherov, N., Gazit, A., Gilon, C., and Livitzki, A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 11134-11142
- 108 Pai, R., Sorgeghan, B., Szabo, I.L., Pavelka, M., Baatar, D., and Tanawski, A.S. (2002) *Natur Med.* **8**, 289-293
- 109 Paniel, E., Akita, R.W., and Sliwkowski, M.X. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 28468-28473
- 110 Pawson, T. (1995) *Nature* **373**, 573-580

- 
- 111 Pierce, K.L., Tohgo, A., Ahn, S., Field, M.E., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 23155-23160
- 112 Post, G.R. and Brown, J.H. (1996) *FASEB J.* **10**, 741-750
- 113 Prenzel, N., Fischer, O.M., Streit, S., Hart, S., and Ullrich, A. (2001) *Endocrin-Rel. Cancer* **8**, 11-31
- 114 Prenzel, N., Zwick, E., Daub, H., Leserer, M., Abraham, R., Wallasch, C., and Ullrich, A. (1999) *Nature* **402**, 884-888
- 115 Ptasznik, A., Traylor-Kaplan, A., and Bokoch, G.M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 19969-19974
- 116 Qian, X., O'Rourke, D.M., Fei, Z., Zhang, H-T., Kao, C-C., and Greene, M.I. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 574-583
- 117 Raab, G., and Klagsbrun, M. (1997) *Biochim. Biophys. Acta.* **1333**, F179-F199
- 118 Roche, S., Downward, J., Raynci, P., and Courtneidge, S. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7119-7125
- 119 Rodriguez-Fernandez, J.L., and Rozengurt, E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 27895-27905
- 120 Roelle, S., Grosse, R., Aigner, A., Krell, H.W., Czubayko, F., and Gudermann, T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 47307-47318
- 121 Sabri, A., Short, J., Guo, J., and Steinberg, S.F. (2002) *Circ. Res.* **91**, 532-539
- 122 Santiskulvong, C., Rozengurt, E. (2003) *Exp Cell Res.* **290(2)**, 437-446
- 123 Sato, K-I., Nagao, T., Iwasaki, T., Nishihira, Y., and Fukami, Y. (2003). *Genes to Cells* **8**, 995-1003
- 124 Sato, K-I., Sato, A., Aoto, M., and Fukami, Y. (1995a) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **215**, 1078- 1087
- 125 Sato, K-I., Sato, A., Aoto, M., and Fukami, Y. (1995b) *Biochim. Biophys. Res. Com.* **210**, 844-851
- 126 Schaefer, G., Akita, R.W., and Sliwkowski, M.X. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 859-866
- 127 Schindler, C., and Darnell, J.E. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 621-651
- 128 Schlessinger, J. (1994). *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 25-30
- 129 Schlessinger, J. (2000a) *Cell* **100**, 293-301
- 130 Schlessinger, J. (2000b) *Cell* **103**, 211-225
- 131 Schlessinger, J. (2002) *Cell* **110**, 669-672
- 132 Schmitt, J.M., and Stork, P.J.S. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 25342-25350
- 133 Schmitt, J.M., and Stork, P.J.S. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3671-3683
- 134 Schmitt, J.M., and Stork, P.J.S. (2002a) *Mol. Cell* **9**, 85-94
- 135 Schmitt, J.M., and Stork, P.J.S. (2002b) *J. Biol. Chem.* **277**, 43024-43032
- 136 Schmitz, U., Ishida, M., and Berk, B.C. (1997) *Circ. Res.* **81**, 550-557
- 137 Schönwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J., and Parker, J. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 790-780

- 
- 138 Schramm, K., Niehof, M., Radziwill, G., Rommel, C., and Moelling, K. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Com.* **201**, 740-747
- 139 Schwartz, T.W., and Rosenkilde, M.M. (1996) *Trends in Pharmacol. Sci.* **17**, 213-216
- 140 Sevetson, B.R., kong, X., and Lawrence Jr., J.C. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10305-10309
- 141 Shah, B.H., Baukal, A.J., Shah, F.B., and Catt, K.J. (2005) *Mol. Endocrinol.* (in press)
- 142 Shah, B.H., Farshori, M.P., Jambusaria, A., and Catt, K.J. (2003a) *J. Biol. Chem.* **278**, 19118-19126
- 143 Shah, B.H., Soh, J.-W., and Catt, K.J. (2003b) *J. Biol. Chem.* **278**, 2866-2875
- 144 Shalloway, D., Coussens, P.M., and Yaiuk, P. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7071-7075
- 145 Sicheri, F., Moarefi, I., and Eck, M.J. (1997) *Nature* **385**, 602-609
- 146 Sorkina, T., Huang, F., Beguinot, L., and Sorkin, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 27433-27441
- 147 Stamos, J., Sliwkowski, M.X., and Eigenbrot, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 46265-46272
- 148 Stern, D.F., and Kamps, M.P. (1988) *EMBO J.* **7**, 995-1001
- 149 Sternberg, M.J., and Gullick, W.J. (1989) *Nature* **339**, 587-591
- 150 Stover, D.R., Becker, M., Liebetanz, J., and Lydon, N.B. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 15591-15597
- 151 Sun, X.J., Crimmings, D.L., Myers, M.G., Miralpeix, M., and White, M.F. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7418-7428
- 152 Takishima, K., Griswold-Prenner, I., Ingebritsen, T., and Rosner, M.R. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2520-2524
- 153 Tenev, T., Keilhack, H., Tomic, S., Stoyanov, B., Stein-Gerlach, M., Lammers, R., Krivtsov, A.V., Ullrich, A., and Böhmer, F.D. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 5966-5973
- 154 Tice, D.A., Biscardi, J.S., Nickles, A.L., and Parson, S.J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1415-1420
- 155 Tilly, B.C., van Paridon, P.A., Verlaan, I., Wirtz, K.W., deLaat, S.W., and Moolenaar, W.H. (1987) *Biochem. J.* **244**, 129-135
- 156 Touhara, K., Hawes, B.E., van Biesen, T., and Lefkowitz, R.J. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9284-9290
- 157 van Biesen, T., Hawes, B.E., Luttrell, D.K., Krueger, K.M., Touhara, K., Profiri, E., Kakane, K., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (1995) *Nature* **376**, 781-784
- 158 van Biesen, T., Luttrell, L.M., Hawes, B.E., and Lefkowitz, R.J. (1996) *Endocrin. Rev.* **17**, 698-705
- 159 Verheijen, M.H. and Defize, L.H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 3423-3429
- 160 Voisin, L., Foisy, S., Giasson, E., Lambert, C., Moreau, P., and Meloche, S. (2002) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C446-C455

- 
- 161 Vossler, M.R., Yao, H., York, R. D., Pan, M.-G., Rim, C.S., and Stork, P.J.S. (1997) *Cell* **89**, 73-82
- 162 Wada, T., Qian, X., and Greene, M.I. (1990) *Cell* **61**, 1339-1347
- 163 Walker, F., Orchard, S.G., Jorisson, R.N., Hall, N.E., Zhang, H.-H., Hoyne, P.A., Adams, T.E., Johns, T.G., Ward, C., Garrett, T.P.J., Zhu, H.-J., Nerrie, M., Scott, A.M., Nice, E.C., and Burgess, A.W. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 22387-22398
- 164 Wan, Y., and Huang, X.-Y. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 14533-14537
- 165 Ward, C.W., Hoyne, P.A., and Flegg, R.H. (1995) *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **22**, 141-153
- 166 Wess, J. (1997) *FASEB J.* **11**, 346-354
- 167 Wetzker, R., and Böhmer, F.D. (2003) *Nature Reviews/Molecular Cell Biology* **4**, 651-657
- 168 Wilson, L.K., Luttrell, D.K., Parsons, J.T., and Parsons, S.J. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1536-1543
- 169 Worthylake, R., and Wily, H.S. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 8594-8601
- 170 Wu, W., Graves, L.M., Gill, G.N., Parson, S.J., and Samet, J.M. (2002). *J. Biol. Chem.* **277**, 24252- 24257
- 171 Xi, S., Zhang, Q., Dyer, K.F., Lerner, E.C., Smithgall, T.E., Gooding, W.E., Kamens, J., and Grandis, J.R. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 31574-31583
- 172 Xu, W., Harrison, S.C., and Eck, M.J. (1997) *Nature* **385**, 595-602
- 173 Yamaguchi, H., and Hendrickson, W.A. (1996) *Nature* **384**, 484-488
- 174 Yan, Y., Shirakabe, K., and Werb, Z. (2002) *J. Cell. Biol.* **158**, 221-226
- 175 Yart, A., Roche, S., Wetzker, R., Laffargue, M., Tonks, N., Mayeux, P., Chap, H., and Raynal, P. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 21167-21178
- 176 Zamah, A.M., Delahunty, M., Luttrell, L.M., and Lefkowitz, R.J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 31249-31256
- 177 Zimmermann, S., and Moelling, K. (1999) *Science* **286**, 1741-1744
- 178 Zhougang S., and Schnellmann, R.G. (2004) *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **286**, F858-F865

## **Anhang**

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AS</b>	<u>A</u> minosäure	<b>Iso</b>	<u>I</u> soprenalin
<b>ATP</b>	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat	<b>K</b>	Lysin
<b>βARK</b>	β- adrenerge <u>R</u> ezeptor <u>K</u> inase	<b>LPA</b>	Lysophosphatid Säure
<b>cAMP</b>	cyklisches <u>A</u> MP	<b>LPAR</b>	Lysophosphatid Säure Rezeptor
<b>CaM</b>	<u>C</u> almodulin	<b>M</b>	Methionin
<b>Csk</b>	<u>C</u> - Terminale <u>S</u> rc- <u>K</u> inase	<b>MAPK</b>	<u>M</u> itogen <u>a</u> ktivierte <u>P</u> rotein <u>K</u> inase
<b>DAG</b>	<u>D</u> iacyglycerol	<b>MBP</b>	<u>M</u> yelin <u>B</u> asic <u>P</u> rotein
<b>dn</b>	dominant <u>n</u> egativ	<b>MEK</b>	<u>M</u> AP/ <u>E</u> RK <u>K</u> inase
<b>DMSO</b>	<u>D</u> imethylsulfoxid	<b>MMP</b>	<u>M</u> atrix <u>M</u> etalloproteinase
<b>DTT</b>	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreitoll	<b>PAGE</b>	Polyacrylamid Gelelektrophorese
<b>ECL</b>	<u>E</u> nhanced <u>c</u> hemiluminescence	<b>PDGFR</b>	<u>P</u> latelet <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor
<b>EGF</b>	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor	<b>PH</b>	<u>P</u> leckstrin <u>H</u> omology
<b>EGFR</b>	<u>E</u> pidermal <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor	<b>PI3-K</b>	<u>P</u> hosphatidylinositol- 3 <u>K</u> inase
<b>EPO</b>	<u>E</u> rythropoetin	<b>PIP<sub>3</sub></b>	<u>P</u> hosphatidylinositol 3,4,5- <u>P</u> hosphat
<b>ERK</b>	<u>E</u> xtracellular <u>R</u> egulated <u>K</u> inase	<b>PKA</b>	<u>P</u> roteinkinase <u>A</u>
<b>F</b>	Phenylalanin	<b>PKB</b>	<u>P</u> roteinkinase <u>B</u>
<b>FGFR</b>	<u>F</u> ibroblast <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>R</u> eceptor	<b>PKC</b>	<u>P</u> roteinkinase <u>C</u>
<b>Gab</b>	<u>G</u> rb <u>A</u> ssociated <u>B</u> inder	<b>PLC</b>	<u>P</u> hospholipase <u>C</u>
<b>Gap</b>	<u>G</u> TPase- activating <u>P</u> rotein	<b>PTB</b>	<u>P</u> hosphotyrosine <u>B</u> inding
<b>GDP</b>	<u>G</u> uanosindiphosphat	<b>PTP</b>	<u>P</u> rotein <u>T</u> yrosin <u>P</u> hosphatase
<b>GH</b>	<u>G</u> rowth <u>H</u> ormon	<b>pY</b>	Phosphotyrosin
<b>GPCR</b>	<u>G</u> - <u>P</u> rotein- coupled <u>R</u> ezeptor	<b>Pyk2</b>	Ca <sup>2+</sup> - abhängige Protein Kinase
<b>Grb2</b>	<u>G</u> rowth- Factor- Receptor <u>b</u> inding Protein	<b>R</b>	Arginin
<b>HB- EGF</b>	Heparin-binding-EGF	<b>Raf-1</b>	Von „Rat Fibrosarcoma“ und ist eine Proteinkinase (Ser/Thr- spez.)
<b>HRP</b>	<u>H</u> orse <u>R</u> eddish <u>P</u> eroxidase	<b>Ras</b>	von „Rat Sarcoma“ und ist ein monomeres G- Protein
<b>IP<sub>x</sub></b>	<u>I</u> nositolphosphate	<b>S</b>	Serin

<b>SDS</b>	<u>S</u> odium <u>d</u> odecylsulfat
<b>SFM</b>	<u>S</u> erum <u>f</u> reies <u>M</u> edium
<b>SH2</b>	<u>S</u> rc <u>H</u> omology <u>2</u>
<b>SH3</b>	<u>S</u> rc <u>H</u> omology <u>3</u>
<b>Shc</b>	<u>S</u> H- <u>c</u> ontaining Protein
<b>Sos</b>	<u>S</u> on <u>o</u> f <u>s</u> evenless
<b>STAT</b>	<u>S</u> ignal <u>T</u> ransducer and <u>A</u> ctivators of <u>T</u> ranscription
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
<b>TGF<math>\alpha</math></b>	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor
<b>WT</b>	<u>W</u> ild <u>t</u> yp
<b>Y</b>	Tyrosin



## Publikationen

**Drube, S., and Liebmann, C.:** In various tumor cell lines the peptide bradykinin B<sub>2</sub> receptor antagonist, HOE 140 (incatibant), may act as mitogenic agonist (2000) *Br. J. Pharmacol.* **131**, 1553-1560

**Hanke, S., Valkova, C., Stirnweiss, J., Drube, S., and Liebmann, C.** Aktivated EGF- Receptor may balance ERK- inhibitory network signalling pathways. *Cellular Signalling* (im Druck)

**Stirnweiss, J., Drube, S., Ziesche, E., Valkova, C., and Liebmann, C.** Muscarinic M2- Receptor mediate transactivation of EGF- Receptor by Fyn and independently of MMPs. *Cellular Signalling* (eingereicht)

**Drube, S., Stirnweiss, J., Valkova, C., Hanke, S., and Liebmann, C.** Ligand- independent and Ligand- supported EGFR- transactivation; lessons from  $\beta$ 2 adrenergic receptor. *Cellular Signalling* (eingereicht)

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die am Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beteiligt waren. Den größten Anteil daran hat meine Familie, die immer an mich geglaubt und mich in jeder Hinsicht unterstützt hat. Besonders hervorzuheben sind dabei meine Eltern, denen ich hiermit besonders danken möchte.

Besonderer Dank gilt auch meiner Freundin Anne, die mich stets unterstützt und mir Kraft und Mut gegeben hat, diese Arbeit zu vollenden.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Claus Liebmann bedanken, der mir ermöglichte, diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen und der mich bei der Planung, Auswertung und Diskussion der Ergebnisse unterstützt hat.

Besonderer Dank gilt auch Carmen „Carmi“ Mertens und Sigrid Reichhardt, die mich bei der Durchführung verschiedener Experimente tatkräftig unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gilt auch meinem Lektorenteam Elli Zische und Sabine März, die sich die Zeit genommen haben, diese Arbeit nach Fehlern durchzusehen und damit keine leichte Aufgabe übernommen haben. Ich möchte hiermit auch Jörg Stirnweiss, Christina Valkova, Sabine Hanke und Sylvia Müller danken, die mir stets mit Rat und Tat bei der Lösung von Problemen zur Seite standen.

Die genannten Personen machten es darüber hinaus möglich, diese Arbeit in einer sehr angenehmen, lockeren, freundschaftlichen und lustigen Atmosphäre anzufertigen.

Mein Dank gilt auch allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Biochemie und Biophysik. Außerdem möchte ich Prof. Dr. Siegmund Reißmann danken, der sich für meine unzähligen Stellenverlängerungen einsetzte und mir dadurch die Möglichkeit gab, diese Arbeit erfolgreich zu beenden.

Ich danke weiterhin Prof. Dr. Jörg Stürzebecher und Dr. Uta Stürzebecher, die mir bei Problemen stets tatkräftig zur Seite standen.

# Lebenslauf

<b>Name:</b>	Drube
<b>Vorname:</b>	Sebastian
<b>Geburtsdatum:</b>	29.08.1974
<b>Geburtsort:</b>	Weimar
<b>Familienstand:</b>	ledig
<b>Schulausbildung:</b>	
1980-1989	Polytechnische Oberschule „Luis Fünberg“, Weimar
1989-1993	Friedrich- Schiller Gymnasium, Weimar
<b>Abschluss:</b>	Juni 1993 Abitur
<b>Zivildienst:</b>	September 1993- November 1994
<b>Studium:</b>	
WS 1995- SS 2000	Studium der Biochemie an der Biologisch- Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich- Schiller- Universität, Jena
<b>Abschluss:</b>	August 2000 Diplom- Biochemiker
<b>seit September 2000:</b>	Promotion am Institut für Biochemie und Biophysik der Biologisch- Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich- Schiller- Universität, Jena

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die Experimente, die zu den hier vorliegenden Ergebnissen führten, selbständig und nur mit Hilfe der hier angegebenen Hilfsmittel und Literatur durchgeführt und angefertigt habe.

Weimar den,

## **Erklärung zur Bewerbung**

Ich erkläre, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad Doctor rerum naturalium beworben habe und dass ich weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des oben genannten akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt habe.

Weimar, den